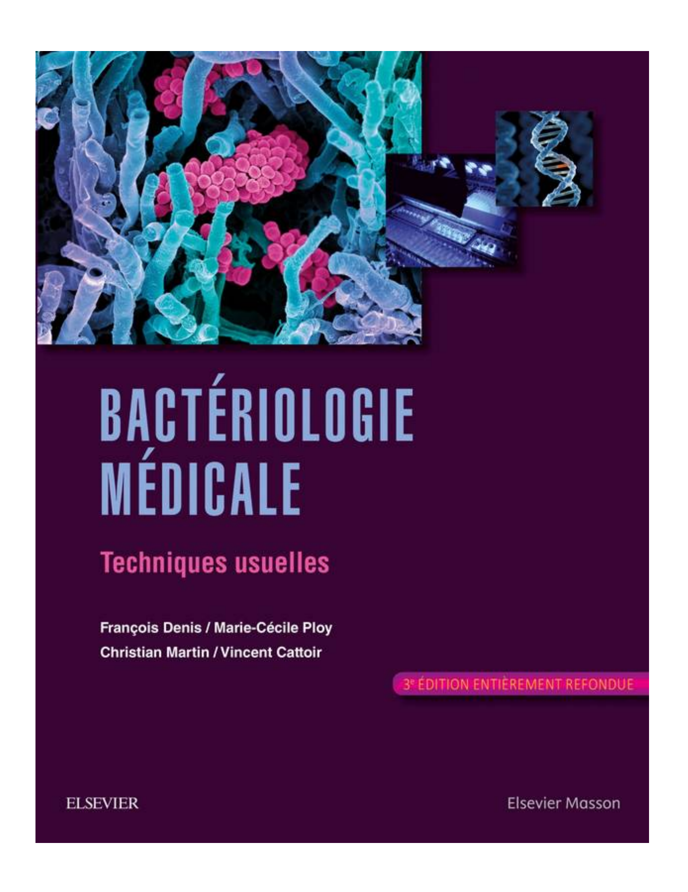


Bactériologie médicale Techniques usuelles



Abréviations

2SP	milieu saccharose-phosphate
AAF	aéro-anaérobie facultatif
Ac	anticorps
ACA	acrodermatite chronique atrophiante
ACCM-2	*acidified citrate cysteine medium*
ADH	arginine dihydrolase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADR	arrêté du 25 avril 2000 modifiant l'arrêté du 5 décembre 1996 modifié
AES	accident d'exposition au sang
AET	aspiration endotrachéale
AFLP	*amplified fragment length polymorphism*
Afnor	Agence française de normalisation
Afssaps	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AFU	Association française d'urologie
ALLO	anticorps antilistériolysine O
ALOA	Agar listeria Ottaviani Agosti®
AMM	autorisation de mise sur le marché
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
Anaes	Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé
ANC	acide nalidixique-colistine
ANSM	Autorité nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
AP-PCR	*arbitrarily-primed polymerase chain reaction*
APGAR	moyen chiffré rapide pour évaluer l'état des grandes fonctions vitales à 1 minute de vie dû à Virginia Apgar
APR	appareils de protection respiratoire
ARDRA	*amplified rDNA restriction analysis*
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ARS	Agence régionale de santé
ASD	antistreptodornases
ASK	antistreptokinase
ASLO	antistreptolysines O
ATP	adénosine triphosphate
ATS	American Thoracic Society
BAAR	bacille acido-alcoolo-résistant
BBE	*Bacteroides*-bile-esculine
BCG	bacille de Calmette et Guérin
BCM	*bacillus cereus medium*
BCP	bromocrésol pourpre
BCSA	British Columbia Safety Authority
BCYE	*buffered charcoal yeast extract*
BET	bromure d'éthidium
BG	milieu solide de Bordet-Gengou
BGN-NF	bacilles à Gram négatif non fermentaires
BHI	*brain heart infusion* (milieu cœur-cerveau)
BHRe	bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes
BIBI	Bioinformatics Bacterial Identification
BIGSdb	*Bacterial isolate genome sequence database*
BK	bacille de Koch
BLAST	*basic local alignement search tool*
BLNAR	*beta-lactamase negative ampicillin resistant*
BLSE	β-lactamase à spectre étendu
BMC	*bacterial medium chromogenic*
BMR	bactérie multirésistante
BNAG	n-acétyl-β-glucosaminidase
BORSA	*borderline oxacillin-resistant S. aureus*
BPCO	bronchopneumopathie chronique obstructive
BPPH	Bonnes pratiques de pharmacie hospitalière
BSK	milieu Barbour-Stoenner-Kelly
BVAB-2	*bacterial vaginosis-associated bacteria 2*
BVHRI	bactéries vaginales à haut risque infectieux
BW	réaction de Bordet-Wassermann
CA-SFM	Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie
CagA	îlot de pathogénicité Cag

CAMP-test test de Christie, Atkins, Munch-Petersen
CAP colistine et aztréonam
CARDS *community acquired respiratory distress syndrome*
CAT milieu campylobacter
CCFA cyclosérine-céfoxitine-fructose-agar
CDC Center for Diseases Control and Prevention
CE corps élémentaire/marquage de la Communauté européenne
CFTR *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
CGG Commission de génie génétique
CHV correspondant d'hémovigilance
CIDDIST Centre d'information, de dépistage et de diagnostic des infections sexuellement transmissibles
CIE contre-immunoélectrophorèse
CIL comparaison interlaboratoire
CIN cefsulodine-irgasan-novobiocine
CIP collection de l'Institut Pasteur
CIQ contrôle interne de qualité
CIRE Cellule inter-régionale d'épidémiologie
CLED cystine-lactose-électrolyte déficient
CLHP chromatographie liquide à haute performance
CLIN Comité de lutte contre les infections nosocomiales
CLSI Clinical Laboratory Standards Institute
CMB concentration minimale bactéricide
CMI concentration minimale inhibitrice
CMV cytomégalovirus
CNA colistine et acide nalidixique
CNR Centre national de référence
Cofrac Comité français d'accréditation
Cp *crossing point*
CP concentrés plaquettaires
CPM colite pseudomembraneuse/concentration de prévention des mutants résistants
CPS carte professionnelle santé
CQ contrôle de qualité
CQN Contrôle de qualité national
CR corps réticulé
CRG concentrés de globules rouges
CRH coordinateur régional d'hémovigilance
CRISPR *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
CRP *C-reactive protein* (protéine C-réactive)
CSH cellules souches hématopoïétiques
CSHPF Conseil supérieur d'hygiène publique de France
Ct *threshold cycle*
CT toxine cholérique
CTA *cystine-tryptic agar*
CTX-M céfotaximase-Munich
DAEC *diffusely-adhering E. coli* (*E. coli* à adhésion diffuse)
DAPI 4′6-diamino-2-phénylindole
DASRI déchets d'activité de soins à risque infectieux
dATP-αS nucléotides alpha-thio-dATP
ddGTP didésoxyribonucléotide à guanine
DDH *DNA-DNA hybridization*
ddNTP didésoxyribonucléotides
DEIA *detection immunoenzymatic assay*
DGS Direction générale de la santé
DHN dermo-hypodermite nécrosante
DMDIV dispositifs médicaux de diagnostic in vitro
DMM dose minimale mortelle
DMSO diméthyl sulfoxide
dNDP désoxydinucléotide phosphate
dNMP désoxymononucléotide phosphate
dNTP désoxyribonucléotides triphosphates
DOP dioctylphtalate
DPC développement professionnel continu
DRIRE Direction régionale de l'industrie de la recherche et de l'environnement
dTTP désoxythymidine triphosphate
DUJ dose unique journalière
dUTP désoxy-uridine triphosphate
EAggEC *E. coli* entéroaggrégatif
EAT épreuve de l'antigène tamponné (test au rose Bengale)
EBLSE entérobactérie β-lactamase à spectre élargi (ou étendu)
EBV virus d'Epstein-Barr
ECA *Enterobacteriaceae common antigen*
ECAD *E. coli* à adhésion diffuse
ECBC examen cytobactériologique des crachats
ECBU examen cytobactériologique des urines
ECDC European Center for Disease Prevention and Control

ECEAg *enteroaggregative E. coli* (*E. coli* entéroagrégatifs)
ECEH ou EHEC *E. coli* entérohémorragiques
ECEI ou EIEC *E. coli* entéro-invasifs
ECEP ou EPEC *E. coli* entéropathogènes
ECET ou ETEC *E. coli* entérotoxinogènes
ECP effet cytopathogène
EDIN *epidermal cell differentiation inhibitor*
EDTA acide éthylène diamine tétracétique
EEQ évaluation externe de la qualité
EFSA European Food Safety Authority
EHEC *Escherichia coli* entéro-hémorragique
EI endocardite infectieuse
EI étalon interne
EIA *enzyme immunoassay*
EIEC *E. coli* entéro-invasif
ELISA *enzyme linked immunosorbent assay*
EM érythème migrant
EMB éosine-bleu de méthylène
EMIT *enzyme multiplied immunotechnique*
EMJH milieu de Ellinghausen-MacCullough modifié par Johnson et Harris
EMT erreurs maximales tolérées
EOH équipe opérationnelle d'hygiène
EOS *extremely oxygen sensitive*
EPA effet postantibiotique
EPC entérobactéries productrices de carbapénémases
EPEC *E. coli* entéropathogène
EPI équipements de protection individuelle
ERG entérocoque résistant aux glycopeptides
ERV entérocoque résistant à la vancomycine
ESBL *extended-spectrum β-lactamase*
ETEC *E. coli* entérotoxinogène
EUCALB European Concerted Action on Lyme Borreliosis (Action concertée européenne sur la borréliose de Lyme)
EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EWGLI European Working Group for Legionella Infection
FAME *fatty acid methyl ester*
FBC *fractional bactericidal concentration*
FFP *filtering facepiece particles*
FIA *fluoro-immunoassay*
FIC *fractional inhibitory concentration*
FPIA *fluorescence polarization immuno-assay*
FRET *fluorescence resonance energy transfer*
FTA *fluorescent treponemal antibody test*
FTA-abs *fluorescent treponemal antibody absorbed*
GALT *gut associated lymphoid tissue*
GAS *Group A Streptococcus*
GB globules blancs
GBEA Guide de bonne exécution des analyses
GC guanine-cytosine
GDH glutamate déshydrogénase
GDV *genomic detection of virus*
GEFH Groupe d'études français des Hélicobacters
γGT gamma-glutamyl transférase
GISA *glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides)
GLU glucose
GNA glomérulonéphrite aiguë
GNAC *Gram-negative anaerobic cocci* (cocci à Gram négatif anaérobies)
GPAC *Gram-positive anaerobic cocci* (cocci anaérobies à Gram positif)
GR globules rouges
GRSA *glycopeptide-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* résistant aux glycopeptides)
GTA guide technique d'accréditation
GVPC BCYE supplémenté en vancomycine, glycine et colistine
HACCP *hazard analysis critical control point*
HACEK ou HACCEK regroupe six espèces de bactéries Gram négatif : *Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* spp., *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* et *Kingela*
HAS Haute autorité de santé
HEG hexéthylène glycol
HEK gélose Hektoen
HEPA *high efficiency particulate air*
HGA *human granulocytic anaplasmosis*

hGISA	*heterogeneous glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* de résistance hétérogène aux glycopeptides)
HME	*human monocytosis Erhlichiosis*
HMP	*Human microbiome project*
HPST	loi hôpital, patients, santé et territoires
HSV-1, HSV-2	virus *herpes simplex* de type 1 ou 2
HTM	*haemophilus test medium*
I	inosine
i.v.	iso-valérique
IC	immunochromatographie/intervalle de confiance
ICD	infection à *C. difficile*
ICSP	International Committee on Systematics of Prokaryotes
IDR	intradermoréaction
IF	immunofluorescence
IFD	immunofluorescence directe
IFI	immunofluorescence indirecte
IFLA	*immunoluminometric assay*
IFMA	*immunofluorometric assay*
IG	immunoglobuline
IGRA	*interferon γ release assay*
IL	interleukine
IM	intramusculaire
IMF	infection maternofœtale
INF	interféron
INRS	Institut national de recherche et de sécurité
InVS	Institut national de veille sanitaire
IOA	infections ostéoarticulaires
IOAC	infections ostéoarticulaires complexes
IPP	inhibiteur de la pompe à protons
IRMA	*immunoradiometric assay*
ISO	*International Organization for Standardization*
IST	infection sexuellement transmissible
ITCB	incident transfusionnel par contamination bactérienne
ITL	infection tuberculeuse latente
ITS	infection transmise sexuellement
ITU	infection du tractus urinaire
IV	intraveineux
JK	*Corynebacterium jeikeium*
KCN	cyanure de potassium
KPC	*Klebsiella pneumoniae* carbapénémase
LAC	lactose
LAM	lipoarabinomannane
LBA	liquide bronchoalvéolaire
LBM	laboratoire de biologie médicale
LCR	*ligase chain reaction*/liquide céphalorachidien
LDC	lysine décarboxylase
LGV	lymphogranulome vénérien ; lymphogranulomatose vénérienne
LIA	*lumino-immunoassay*
LiPA	*line probe assay*
LLAP	*legionella-like-amoebal pathogens*
LNE	Laboratoire national d'essai
LPS	lipopolysaccharide
LPSN	List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature
LT	entérotoxine thermolabile
MAC	mycobactéries du complexe aviaire
MAI	maladie auto-immune
MALDI-TOF	*matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight*
MALT	*mucosa associated lymphoid tissue*
MAP	menace d'accouchement prématuré
MAQ	Manuel d'assurance qualité
MAT	*microscopic agglutination test* (test d'agglutination microscopique)
mCCD	*modified cefoperazone charcoal deoxycholate* (milieu campylobacter-charbon)
MCLO	*mycobacterium chelonae like-organism*
MDO	maladies à déclaration obligatoire
MetaHIT	*Metagenomics of the Human Intestinal Tract*
MEVAG	milieu de Hugh et Leifson
MEYP	milieu *mannitol-egg yolk-polymyxin B agar*
MGG	coloration de May-Grünwald-Giemsa
MGIT	*mycobacteria growth indicator tube*
MH	gélose de Mueller-Hinton
MICI	maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MIF	micro-immunofluorescence
MIRU	*mycobacterial interspersed repetitive units*
MLEE	*multilocus enzyme electropherotype*
MLS	macrolides, lincosamides, streptogramines
MLSA	*multilocus sequence analysis*

MLSK	macrolides-lincosamides-streptogramines-kétolides
MLST	*multilocus sequence typing*
MNT	mycobactérie non tuberculeuse
MODSA	*modified PBP S. aureus*
MOMP	*major outer membrane protein* (protéine majeure de membrane externe)
MOT	micro-organismes et toxines hautement pathogènes
MRS	milieu de Man, Rogosa et Sharpe
MSCRAMMS	*microbial surface component reacting with adhesive matrix molecules*
MST	maladie sexuellement transmissible/*multispacer sequence typing*
MTBC	*Mycobacterium tuberculosis complex*
MVLA	*multilocus variable number of tandem repeats analysis*
NABM	nomenclature des actes de biologie médicale
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide ou coenzyme I
NASBA	*nucleic acid sequence based amplification*
NBT	nitro blue de tétrazolium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	*next-generation high-throughput DNA sequencing technologies*
NSB	niveau de sécurité biologique
OADC	acide oléique, albumine, dextrose, catalase
OCIL	Organismes de comparaisons interlaboratoires
ODC	ornithine décarboxylase
OFPBL	*oxidative-fermentative-polymyxin B-bacitracin-lactose agar*
OGM	organisme génétiquement modifié
OIA	*optical immunoassay*
OLA	*oligonucleotide ligation array*
OM	*outer membrane* (protéine de surface)
OMA	otite moyenne aiguë
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONERBA	Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques
ONPG	ortho-nitro-phényl-galacto-pyranoside
PAC	pneumonie aiguë communautaire
PaGIA	*particle gel immunoassay*
PAS	*periodic acid schiff*
pb	paire de bases
PBS	*phosphate buffer saline* (tampon phosphate)
PCR	*polymerase chain reaction*
PCT	procalcitonine plasmatique
PEA	phényléthylalcool
PEG	polyéthylène glycol
PEMBA	milieu *polymyxin B-egg yolk-mannitol-bromothymol blue agar*
PFGE	*pulsed field gel electrophoresis*
PG	peptidoglycane
PHA	*passive hemagglutination* (hémagglutination passive)
PK/PD	*pharmacokinetics/pharmacodynamics*
PL	ponction lombaire
PLET	polymyxine, lysozyme, EDTA, acétate de thallium
PLP	protéines de liaison à la pénicilline
PMA	procréation médicalement assistée
PNN	polynucléaires neutrophiles
PNPG	para-nitro-phényl-galacto-pyranoside
POMP	*polymorphic outer membrane protein*
PRA	*PCR-restriction enzymatic analysis*
PRP	polyribosil ribitol phosphate
PSL	produits sanguins labiles
PSM	poste de sécurité microbiologique
PSP	ponction vésicale sus-pubienne
PT	purpura thrombopénique
PTI	purpura thrombopénique infectieux
PTT	purpura thrombotique thrombopénique
PUI	pharmacie à usage intérieur
PVL	toxine de Panton-Valentine
PYR	test de l'hydrolyse du pyroglutamate ; pyrrolidonyl arylamidase ; L-pyrrolidonyl-β-naphtylamide
PYRA	pyrrolidonyl arylamidase
QRDR	*quinolone resistance determining region*
R	*rough*
RAA	rhumatisme articulaire aigu
RAPD	*random amplified polymorphic DNA*
RAQ	responsable assurance qualité
Rémic	référentiel en microbiologie médicale
RENACHLA	Réseau national des *Chlamydiae*
RENAGO	Réseau national des gonocoques

rep-PCR *repetitive sequence-based PCR*
RFC réaction de fixation du complément
RFLP *restriction fragment length polymorphism* (restriction enzymatique)
RIA *radio-immunoassay*/radio-immunologique
RIB ribose
RIC *Clostridium ramosum, innocuum, clostridioforme*
RLU *relative light unit*
RM réaction rouge de méthyle
RPM rupture prématurée des membranes
RPR *rapid plasma reagin*
RR risque relatif
RT-PCR *reverse transcription polymerase chain reaction*
RVS bouillon Rappaport Vassiliadis
S *smooth*
SA semaine d'aménorrhée
SARM *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
SASM *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline
SAU service d'accueil des urgences
SAW séroagglutination de Wright
SBA *sheep-blood-agar* (gélose de base Columbia additionnée de sang de mouton)
SBT *sequence-based typing*
SCN staphylocoques à coagulase négative
SCTS syndrome de choc toxique streptococcique
SCV *small colony variant*
SDA Strand Displacement Amplification®
SDS sodium-dodécyl-sulfate
SFHH Société française d'hygiène hospitalière
SFM Société française de microbiologie
SG sérum Sven Gard
SGA streptocoque β-hémolytique du groupe A
SGL système de gestion de laboratoire
SHA solution hydroalcoolique
SHU syndrome hémolytique et urémique
SHV sulfhydryl variable
SIL système informatique de laboratoire
SIR Sensibilité-Intermédiaire-Résistance Scan®
SMAC *sorbitol MacConkey agar* (milieu de MacConkey au sorbitol)
SMID *salmonella medium identification-detection*
SMQ système de management de la qualité
SNC système nerveux central
SNP *single nucleotides polymorphism*
SPHA *solid phase hemadsorption assay*
SPILF Société de pathologie infectieuse de langue française
SPS *sodium polyanethol sulfonate* (polyanéthol sulfonate de sodium)
SRIS syndrome de réponse inflammatoire systémique
SS *Salmonella Shigella*
SSTT système de sécrétion type III
ST entérotoxine thermostable/séquence type
STB streptocoque du groupe B
STEC *Escherichia coli* entérohémorragique
Stx shigatoxine
TAAN test d'amplification de l'acide nucléique
TB tuberculose
TCBS thiosulfate-citrate-bile-saccharose
TCCA taurocholate, cyclosérine, céfoxitine agar
TDA tryptophane désaminase
TDR tests de diagnostic rapide
TEM Temoneira (nom de patient)
TGV transport de germes vivants
TIAC toxi-infection alimentaire collective
Tm *melting temperature*
TMA *transcription-mediated amplification*
TMD transport des marchandises dangereuses
TMI transport des matières infectieuses
TNF *tumor necrosis factor*
TP temps de prothrombine
TPHA *treponema pallidum haemagglutination assay*
TPI *treponema pallidum immobilization test* (test d'immobilisation des tréponèmes)
TPPA *treponema pallidum particle agglutination assay*
TROD tests rapides d'orientation diagnostique
TS gélose trypticase soja

TSC	tryptose-sulfite-cyclosérine
TSH	*tryptone-soja-horse blood* (gélose TS additionnée de sang de cheval)
TSI	*Triple-Sugar-Iron*
TSN	tryptone-sulfite-néomycine
TSST	*toxic shock syndrome toxin*
TTG	taurocholate-tellurite-gélatine
TWAR	*Taiwan acute respiratory disease*
UCC	unité de changement de couleur
UFC	unité formant une colonie
UFS	unité formant un spot
UI	unité internationale
UNG	urétrite non gonococcique
UTI	*urinary tract infection*
UV	ultraviolet
VacA	cytotoxine vacuolisante
VCAT	vancomycine, colistine, amphotéricine B, triméthoprime
VCF	vancomycine, colistine, fungizone
VCN	vancomycine, colistine, nystatine
VCNT	vancomycine, colistine, nystatine, triméthoprime
VDRL	Veneral Disease Research Laboratory
VF	gélose viande-foie
VHB	virus de l'hépatite B
VHC	virus de l'hépatite C
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VISA	*vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* de sensibilité intermédiaire à la vancomycine)
VNTR	*variable number tandem repeat*
VP	réaction de Voges-Proskauer
VPN	valeurs prédictives négatives
VPP	valeurs prédictives positives
VRSA	*vancomycin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine)
VS	vitesse de sédimentation
VTEC	*verotoxin producing E. coli*
VZV	virus de la varicelle et du zona
WB	*Western-blot* ou immunotransfert
WGS	*whole genome sequencing*

Liste des collaborateurs

Barbeyrac (de) Bertille, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, responsable du Centre national de référence des infections à *Chlamydiae*, laboratoire de bactériologie, centre hospitalier universitaire Bordeaux 2

Barraud Olivier, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

Bébéar Cécile M., professeur des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, centre hospitalier universitaire de Bordeaux, Université Victor Segalen Bordeaux 2

Bébéar Christiane, professeur des universités, praticien hospitalier, chef de service de bactériologie, centre hospitalier universitaire de Bordeaux, Université Victor Segalen Bordeaux 2

Beraud Laëtitia, praticien attaché, laboratoire de bactériologie, CNR des légionelles, Groupement hospitalier Est, Lyon

Bingen Édouard†, ancien professeur des universités, praticien hospitalier, chef du service de microbiologie, hôpital Robert Debré, Paris

Bonacorsi Stéphane, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de microbiologie, hôpital Robert Debré, Paris

Bouchiat Coralie, assistante hospitalo-universitaire, laboratoire de bactériologie, Bron

Buisson Yves, médecin biologiste, professeur agrégé du Val-de-Grâce, membre de l'Académie nationale de médecine

Burucoa Christophe, professeur des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, centre hospitalier universitaire de Poitiers, EA 3807 « Diversité génétique et antigénique de *Helicobacter pylori* », Université de Poitiers

Cattoir Vincent, professeur des universités, praticien hospitalier, chef de service de microbiologie, centre hospitalier universitaire de Caen

Denis François, professeur émérite des universités, Faculté de médecine et centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges, membre de l'Académie nationale de médecine

Descours Ghislaine, praticien attaché, laboratoire de bactériologie, CNR des légionelles, Groupement hospitalier Est, Lyon

Drouet Mireille, praticien hospitalier, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

Dupieux Céline, assistante hospitalo-universitaire, laboratoire de bactériologie, La Croix Rousse, Lyon

Durand Géraldine, Pharm. D. PhD, EU R&D Microbiology Director, bioMérieux,La Balme des Grottes

Essemilaire Luc, biologiste-consultant, Montauban

Fenollar Florence, professeur des universités, praticien hospitalier, unité des rickettsies, Marseille

Gaillot Olivier, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, centre hospitalier universitaire, Lille

Garnier Fabien, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

Guérin François, praticien hospitalier, Université de Caen

Hidri Nadia, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

Isnard Christophe, assistant hospitalo-universitaire, Université de Caen

Jarraud Sophie, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, Faculté de médecine Laënnec, Lyon

Jaulhac Benoît, professeur des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, Hôpitaux universitaires de Strasbourg

Jehl François, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, Hôpitaux universitaires de Strasbourg

Lambert Thierry, professeur des universités, chef de service adjoint, Faculté de pharmacie Paris XI, laboratoire de la fondation Hôpital Saint-Joseph, Paris

Lanotte Philippe, maître de conférences des universités, Faculté de pharmacie de Tours, praticien hospitalier, centre hospitalier universitaire Bretonneau, Tours

Lavigne Jean-Philippe, professeur des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie-virologie-parasitologie, centre hospitalier universitaire Carémeau, Nîmes

Le Brun Cécile, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, Hôpital Bretonneau, Tours

Le Hello Simon, co-directeur du Centre national de référence *E. coli/Shigella/Salmonella*, Institut Pasteur, Paris

Lina Gérard, professeur des université, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, Centre de biologie et d'anatomie pathologique sud, Faculté de médecine Laennec, Lyon

Loubinoux Julien, maître de conférences des universités, service de bactériologie, Groupe hospitalier Cochin, AP–HP, Paris

Mainardi Jean-Luc, professeur des universités, praticien hospitalier, responsable de l'unité mobile de microbiologie clinique, service de microbiologie, Hôpital européen Georges Pompidou, Faculté de médecine René Descartes, Paris

Mariani-Kurkdjian Patricia, praticien hospitalier, service de microbiologie, Centre national de référence associé *E. coli*, Hôpital Robert Debré, Paris

Martin Christian, biologiste des hôpitaux, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

Martino (de) Sylvie, maître de conférences des universités, Faculté de médecine Louis Pasteur, Strasbourg, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, Hôpitaux universitaires de Strasbourg

Mereghetti Laurent, professeur des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie, centre hospitalier universitaire Bretonneau, Tours

Mounier Marcelle, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

O'Callaghan David, directeur U 1047 – mixte avec Université de Montpellier, Virulence bactérienne et maladies infectieuses, UFR de médecine, Nîmes

Pereyre Sabine, maître de conférences, praticien hospitalier, centre universitaire de Bordeaux, Université Victor Segalen, Bordeaux 2

Pestourie Nathalie, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

Peuchant Olivia, praticien hospitalier, centre universitaire de bordeaux, Université Victor Segalen, Bordeaux 2

Philippon Alain, professeur émérite, Faculté de médecine René Descartes, Paris

Piva Claude, professeur honoraire des universités, Faculté de médecine, Limoges

Plainvert Céline, praticien attaché, service de bactériologie, Groupe hospitalier Cochin, AP–HP, Paris

Ploy Marie-Cécile, professeur des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

Poupet Hélène, praticien hospitalier, service de bactériologie, Groupe hospitalier Cochin, AP–HP, Paris

Poyart Claire, professeur des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie, Groupe hospitalier Cochin, AP–HP, Paris

Quentin Roland, professeur des universités, praticien hospitalier, chef de service de bactériologie et hygiène hospitalière, centre hospitalier universitaire Trousseau, Tours

Ranc Anne-Gaëlle, praticien attaché, laboratoire de bactériologie, Centre national de référence des légionelles, Groupement hospitalier Est, Lyon

Ranger-Rogez Sylvie, professeur des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie-hygiène, centre hospitalier universitaire Dupuytren, Limoges

Riegel Philippe, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, laboratoire de bactériologie, Hôpitaux universitaires de Strasbourg

Tankovic Jacques, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie-virologie, centre hospitalier universitaire Saint-Antoine, Paris

Tazi Asmaa, maître de conférences des universités, praticien hospitalier, service de bactériologie, Groupe hospitalier Cochin, AP–HP, Paris

Van Belkum Alex, PhD, Corporate Vice President, bioMérieux, La Balme Les Grottes

Vandenesch François, professeur des universités, praticien hospitalier, Faculté de médecine Laënnec, Lyon

Remarques liminaires

F. Denis

Le biologiste a l'entière responsabilité de l'examen bactériologique des prélèvements de la phase préanalytique jusqu'au résultat.

Il est bien évident que l'organisation, les locaux, les équipements, la compétence du personnel technique et d'encadrement interviennent dans la qualité des résultats.

Dans le chapitre de technologies générales, nous n'aborderons pas le problème trop vaste des locaux qui doit prendre en compte le cheminement des échantillons, la spécificité de la technologie bactériologique, notamment la prévention des contaminations des échantillons et des manipulateurs. Mais seront développés les aspects touchant à la sécurité avec définition des niveaux de confinement requis et à la maîtrise de la qualité qui occupent une place croissante.

La stérilisation détaillée dans la précédente édition n'est pas reprise dans cette version.

Les aspects touchant à la démarche à suivre dans un laboratoire méritent d'être rappelés et développés, car le respect des étapes et la compréhension et la maîtrise des paramètres étudiés sont primordiaux pour tout bactériologiste débutant qui ne doit pas faire une confiance aveugle aux pratiques mises en place avant son arrivée dans un laboratoire, ou pour tout bactériologiste confirmé qui doit redouter les dérives d'« habitudes ». Pour éviter celles-ci, les procédures doivent être écrites, respectées et labellisées dans le cadre d'une accréditation.

Nous n'en sommes pas encore au stade du « tout moléculaire », mais s'ouvrent des perspectives permettant de combiner amplification génique et spectrométrie de masse, et ces techniques permettent de porter dans des délais très courts des diagnostics d'espèce à partir de culture.

La sérologie est en perte de vitesse car elle permet un diagnostic tardif avec souvent une spécificité relative.

Aujourd'hui, dans un premier temps, on se limite à une recherche spécifique afin de porter des diagnostics difficiles ou rapides devant une urgence. La recherche de résistance aux antibiotiques (par détection du support moléculaire de la résistance) directement sur les prélèvements n'est pas encore entrée dans la routine mais est enthousiasmante, comme c'est le cas pour la détection simultanée de *Mycobacterium tuberculosis* et de la résistance à la rifampicine sur crachats.

Nous irons de plus en plus vers la recherche de l'identification bactérienne et des résistances aux antibiotiques presque « en temps réel ».

Demain, ces techniques tendront vers une approche syndromique, en passant au-delà des frontières traditionnelles (bactéries, virus, parasites).

Les germes une fois identifiés, ces outils moléculaires permettent des comparaisons de souches dans une perspective épidémiologique. Cela nécessite la constitution d'une souchothèque.

Les laboratoires seront de plus en plus automatisés, mais si les automates simplifient la tâche des biologistes, ils doivent renforcer leur vigilance et leur esprit critique.

Enfin, l'informatique révolutionne la vie des laboratoires en permettant des améliorations en termes de prescription, de traçabilité des prélèvements, de rendu des résultats, de gestion des souchothèques, des sérothèques ; l'accès à différents sites permet de compléter les connaissances, de mieux identifier les souches, voire de comparer les résultats obtenus à des banques de données.

Cette partie n'a pas vocation à être exhaustive, mais elle met l'accent sur certains points qui nous semblent essentiels dans le bon fonctionnement d'un laboratoire, ainsi que sur une analyse critique des résultats. L'objectif final est de fournir au clinicien et au malade une biologie de qualité !

Chapitre 2

Microbiotes humains

V. Cattoir

PLAN DU CHAPITRE

Généralités

Chez un homme sain, les tissus internes sont normalement stériles tandis que les tissus de surface (peau et muqueuses) sont colonisés par divers micro-organismes, constituant de véritables écosystèmes. Cet ensemble de communautés microbiennes (bactéries, archées, virus, champignons et protozoaires) présent au niveau d'un environnement défini (par exemple site anatomique donné ou organisme entier) constitue le microbiote, anciennement appelé (micro)flore. Ce terme récent n'est pas à confondre avec le microbiome qui correspond à l'habitat entier comprenant les micro-organismes, leurs génomes et les interactions environnementales. Le nombre de micro-organismes est environ 10 fois plus élevé que celui des cellules humaines d'un organisme et le rapport du nombre total de gènes bactériens sur celui du génome humain est de 100:1 à 1000:1. Ces communautés microbiennes co-évoluent au contact de nos cellules et de nos tissus depuis des milliers d'années sous forme d'interactions mutualistes et sont donc essentielles à notre survie. Elles constituent notamment la première ligne de défense contre les infections en empêchant la colonisation de l'hôte par des micro-organismes potentiellement pathogènes et jouent un rôle majeur dans le développement du système immunitaire.

Alors qu'il existe quelques études sur la partie fongique (mycobiome) ou virale (virome) du microbiome, la majorité des études faites sur le sujet portent sur les communautés bactériennes. Même si ces deux volets ont certainement un rôle important dans l'écologie microbienne, seul le microbiome bactérien sera traité en détail dans ce chapitre.

Techniques d'étude

La culture a longtemps été la méthode de référence pour l'identification et la caractérisation des micro-organismes présents au sein de communautés bactériennes. Actuellement, il apparaît que la majorité des bactéries ne sont pas cultivables in vitro et qu'il y a donc un biais évident dans l'étude du microbiote par les méthodes de culture classiques. Par exemple, environ 80 % des bactéries du microbiote intestinal ne sont pas cultivables dans les conditions standard de laboratoire. Cependant, l'utilisation optimisée d'un panel pertinent de nombreuses conditions de culture peut permettre la détection de nombreuses bactéries a priori non cultivables. Cette approche, dénommée culturomique, correspond à cette diversification de conditions de culture combinée avec une identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF de chaque colonie isolée. Les méthodes moléculaires (voir ci-dessous) et la culturomique sont complémentaires (en effet, seulement 15 % des espèces sont retrouvées par les deux approches) alors qu'elles présentent des performances similaires en termes de nombre d'espèces identifiées.

Les méthodes moléculaires ont récemment supplanté la culture pour l'étude des microbiotes, notamment avec l'avènement des techniques de séquençage à haut débit. Il est donc possible actuellement de déterminer l'ensemble des génomes et des gènes d'un microbiote donné (appelé métagénome) par séquençage de l'ADN total extrait à partir d'un échantillon suivi d'une comparaison à une banque de données et d'une annotation (c'est la technique de métagénomique). Une autre approche pour l'analyse de la diversité bactérienne d'un microbiote est la métataxonomique, qui a pour principe l'amplification, le séquençage et l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S, marqueur bactérien universel. Un biais important de ces méthodes est leur sensibilité. Par exemple, pour le microbiote intestinal (environ 10^{12} bactéries par gramme de selles), l'analyse métagénomique n'est pas capable de détecter des bactéries présentes à une concentration $< 10^5$ par gramme. Une autre limite est l'impossibilité de distinguer les bactéries viables et non viables. L'analyse dynamique des profils d'expression des gènes au sein d'un microbiome est appelée métatranscriptomique tandis qu'au niveau protéique cela correspond à la méthode de métaprotéomique. Enfin, l'étude des profils métaboliques (métabolomique) au niveau de systèmes complexes tels qu'un microbiome est appelé métabonomique.

La compréhension des relations symbiotiques entre le microbiote et son hôte repose sur la caractérisation du

microbiote normal et de ses variations potentiellement associées à des pathologies. De vastes projets de métagénomique ont été lancés afin de décrypter les différents microbiotes humains au niveau européen (MetaHIT pour *Metagenomics of the Human Intestinal Tract*) et américain (HMP pour *Human microbiome project*). Grâce à ces travaux, il a été possible d'apprécier la diversité bactérienne à différents niveaux : phyla, famille, genre et espèce (Tableau 2.1).

Enfin, pour déterminer le rôle joué par les micro-organismes potentiellement associés à un phénotype, les chercheurs utilisent comme modèles expérimentaux soit des animaux dont le microbiote est connu (ils sont dits gnotobiotiques), soit d'autres qui en sont totalement dépourvus (ils sont dits axéniques).

Tableau 2.1 **Classification hiérarchique des principales bactéries retrouvées chez l'homme.**

Phyla	Familles	Genres
Actinobacteria		
	Actinomycetaceae	*Actinobaculum, Actinomyces, Arcanobacterium, Mobiluncus, Trueperella*
	Corynebacteriaceae	*Corynebacterium, Turicella*
	Mycobacteriaceae	*Mycobacterium*
	Cellulomonadaceae	*Tropheryma*
	Micrococcaceae	*Micrococcus, Rothia, Stomatococcus*
	Propionibacteriaceae	*Propionibacterium*
	Bifidobacteriaceae	*Bifidobacterium, Gardnerella, Scardovia*
	Coriobacteriaceae	*Atopobium, Collinsella, Eggerthella*
Bacteroidetes		
	Bacteroidaceae	*Bacteroides*
	Porphyromonadaceae	*Porphyromonas, Proteiniphilum, Tannerella*
	Prevotellaceae	*Prevotella, Xylanibacter*
	Flavobacteriaceae	*Capnocytophaga*
Firmicutes		
	Bacillaceae	*Bacillus*
	Listeriaceae	*Listeria*
	Staphylococcaceae	*Staphylococcus*
	Aerococcaceae	*Abiotrophia, Aerococcus*
	Carnobacteriaceae	*Dolosigranulum, Granulicatella*
	Enterococcaceae	*Enterococcus*
	Lactobacillaceae	*Lactobacillus*
	Streptococcaceae	*Lactococcus, Streptococcus*
	Clostridiaceae	*Clostridium, Saccharofermentans*
	Eubacteriaceae	*Eubacterium*
	Lachnospiraceae	*Butyrivibrio, Coprococcus, Roseburia*
	Peptostreptococcaceae	*Peptostreptococcus*
	Ruminococcaceae	*Anaerotruncus, Faecalibacterium, Ruminococcus*
	Veillonellaceae	*Dialister, Megasphaera, Veillonella*
Fusobacteria		
	Fusobacteriaceae	*Fusobacterium*
	Leptotrichiaceae	*Leptotrichia, Sneathia*
Proteobacteria		
α-Proteobacteria	*Rhizobiaceae*	*Rhizobium*
	Rhodospirillaceae	*Inquilinus*

β-Proteobacteria	*Alcaligenaceae*	*Achromobacter, Alcaligenes, Bordetella, Oligella*
	Burkholderiaceae	*Burkholderia, Pandoraea, Ralstonia*
	Oxalobacteraceae	*Oxalobacter*
	Neisseriaceae	*Eikenella, Kingella, Neisseria*
δ-Proteobacteria	*Desulfovibrionaceae*	*Bilophila, Desulfovibrio, Lawsonia*
ε-Proteobacteria	*Campylobacteraceae*	*Arcobacter, Campylobacter*
	Helicobacteraceae	*Helicobacter, Wollinella*
γ-Proteobacteria	*Aeromonadaceae*	*Aeromonas*
	Enterobacteriaceae	*Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Morganella, Pantoea, Proteus, Providencia, Raoultella, Salmonella, Serratia, Shigella*
	Legionellaceae	*Legionella*
	Pasteurellaceae	*Aggregatibacter, Haemophilus*
	Moraxellaceae	*Acinetobacter, Moraxella*
	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*
	Vibrionaceae	*Vibrio*
	Xanthomonadaceae	*Lysobacter, Stenotrophomonas*
Spirochaetes		
	Brachyspiraceae	*Brachyspira*
	Leptospiraceae	*Leptospira*
	Spirochaetaceae	*Treponema*
Synergistetes		
	Synergistaceae	*Jonquetella*
Tenericutes		
	Mycoplasmataceae	*Mycoplasma, Ureaplasma*
Verrumicrobia		
	Akkermansiaceae	*Akkermansia*

Microbiote oral

La cavité orale comprend des niches écologiques très diverses (salive, gencives, dents, langue, joues, palais, amygdales, etc.), toutes très riches en diversité microbienne, notamment la plaque dentaire. L'environnement de la cavité orale serait aussi hétérogène que celui de l'intestin, avec environ 50 % de bactéries non cultivables. Entre 500 et 10 000 espèces résideraient dans la cavité orale humaine, appartenant à plus de 200 genres bactériens différents dont (Fig. 2.1) : *Actinomyces*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Streptococcus*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Abiotrophia*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Veillonella*, *Rothia*, *Capnocytophaga*, *Selenomonas*, *Treponema* et *Derxia*. Comme la cavité orale est la porte d'entrée principale de l'organisme, il est aussi possible de détecter la présence de micro-organismes retrouvés dans les aliments ou dans l'air (par exemple *Rhizobium*, *Legionella*). Les espèces prédominantes retrouvées dans la majorité des sites sont *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Gemella haemolysans*, *Granulicatella adiacens* et *Veillonella parvula*. À noter que le microbiote oral n'est pas différent entre l'homme et la femme mais qu'il varie significativement avec l'âge.

Tandis que les communautés microbiennes ont un rôle protecteur, la cavité orale contient également des pathogènes impliqués dans des pathologies locales (par exemple caries dentaires, parodontopathies) et systémiques (par exemple endocardites, pneumopathies d'inhalation). Les caries dentaires sont classiquement décrites à *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus*, mais des nouvelles espèces ont été récemment identifiées comme les bacilles à Gram positif anaérobies *Scardovia wiggsiae* et *Bifidobacterium dentium*. La parodontite est associée à un déséquilibre du microbiote, et un groupe de pathogènes, appelé « complexe rouge » (comprenant *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola*), est fortement associé à cette pathologie. D'autres espèces ont également été associées à la parodontite comme *Eubacterium saphenum* et de multiples phylotypes de *Treponema* spp. tandis qu'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* est classiquement associé à sa forme agressive. Les endocardites sont majoritairement dues aux streptocoques de la cavité orale, dont elles sont les principaux colonisateurs (>25 espèces différentes, > 25 % des espèces de la salive) grâce à leurs propriétés adhérentes et métaboliques.

Microbiote intestinal

L'appareil digestif présente des caractéristiques impressionnantes : c'est le premier organe immunitaire (avec

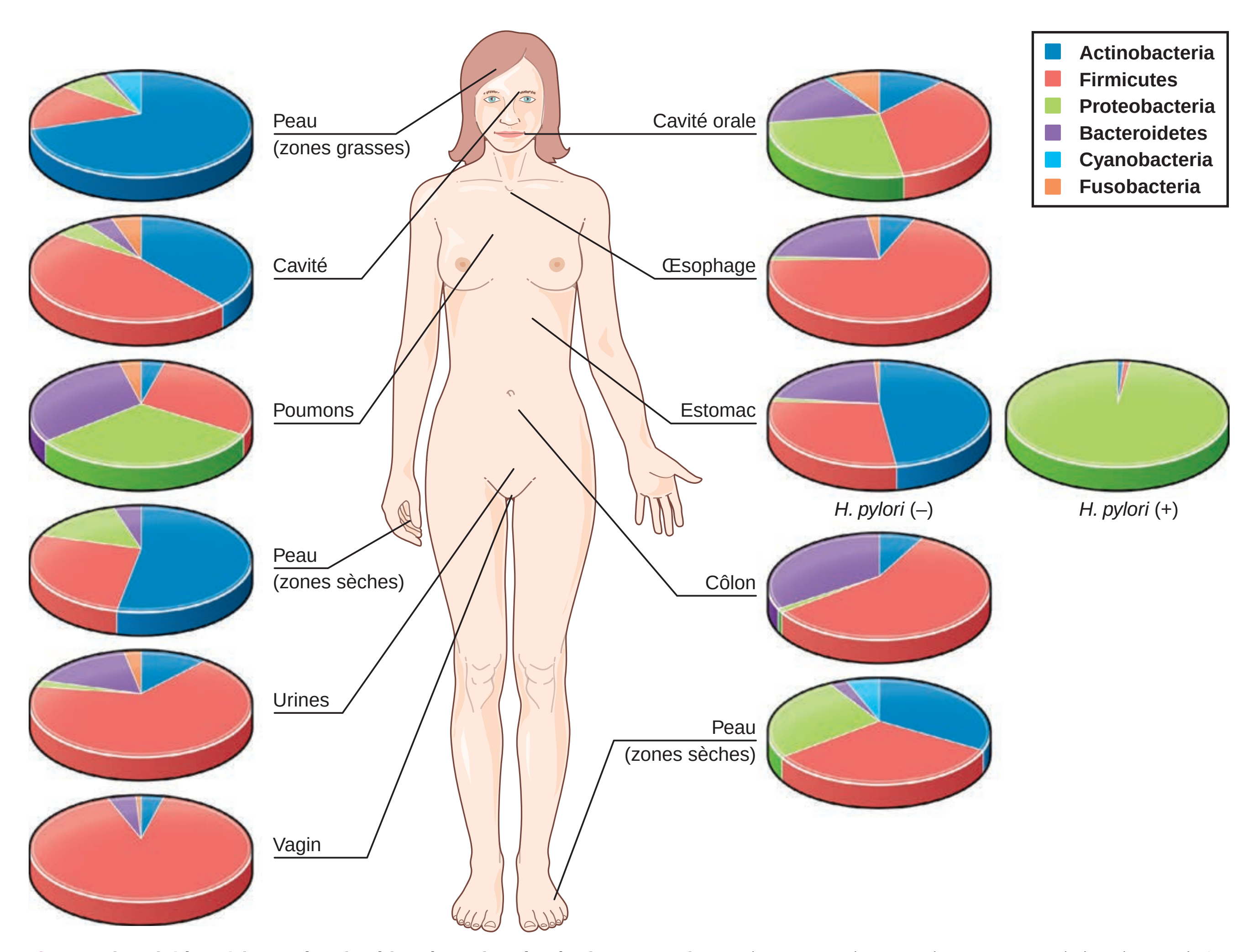


Fig. 2.1 Diversité bactérienne du microbiote humain selon le site anatomique. Chaque part de camembert représente l'abondance relative de chacun des six phyla principaux (données obtenues par métataxonomique).

60 à 70 % des cellules immunitaires du corps), c'est un deuxième cerveau (avec 100 à 200 millions de neurones) et sa surface (estimée à 400 m^2) est énorme. Le nombre de bactéries au sein du microbiote intestinal est d'environ 10^{14} avec 500 à 1000 espèces bactériennes différentes, la plupart étant présentes au niveau du côlon. Une très large majorité d'entre elles ont un métabolisme anaérobie (environ 75 %) et 95 % du microbiote est représenté par 5 phyla bactériens : Firmicutes et Bacteroidetes sont dominants tandis que Actinobacteria, Proteobacteria et Verrumicrobia sont sous-dominants (Tableau 2.2, Fig. 2.1).

La structure et la biodiversité du microbiote intestinal varient significativement selon l'étage anatomique du tube digestif (Fig. 2.2). Il y a notamment une différence marquée en nombre de bactéries qui va de 10^1 à 10^{12} par gramme de contenu de l'œsophage au côlon (ce dernier contenant environ 70 % des micro-organismes du microbiote humain). Ce gradient de densité bactérienne est aussi proportionnel à l'augmentation du pH, la baisse de la tension en O_2 et la diminution de la vitesse du transit. Il y a également une différence axiale entre le microbiote de la lumière intestinale et celui associé à la muqueuse.

Alors que la composition du microbiote intestinal est très divergente d'un individu à un autre, les profils fonctionnels des gènes sont assez similaires. Il existerait trois groupes d'individus définis selon la composition et la fonction de leur microbiote intestinal, appelés « entérotypes ». L'entérotype 1 est dominé par le genre *Bacteroides* tandis que l'entérotype 2 est dominé par le genre *Prevotella*. Enfin, l'entérotype 3 est plus complexe et plus diversifié avec une prédominance de *Ruminococcus*.

La composition du microbiote chez l'adulte sain reste relativement stable au cours du temps. En revanche, le microbiote intestinal des bébés change très rapidement au cours des trois premières années de vie avant de devenir mature et fonctionnellement stable. Le fœtus étant normalement stérile, la colonisation initiale a lieu au moment de la naissance et elle dépend du mode d'accouchement. Les bébés nés par voie basse acquièrent un microbiote proche de celui du vagin de la mère (*Lactobacillus* et *Prevotella*), tandis que ceux nés par césarienne acquièrent un microbiote dérivé de celui de la peau (*Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium*). Il y a aussi des différences significatives selon que l'enfant est nourri par allaitement mater-

nel ou non. Même s'il existe des facteurs génétiques de l'hôte, le régime alimentaire est le déterminant le plus important impliqué dans la composition, la diversité et la richesse du microbiote intestinal, même au cours de l'âge adulte. Les antibiotiques ont évidemment aussi un grand rôle dans l'écologie du microbiote intestinal avec des effets potentiels à court ou à long terme.

Le microbiote intestinal constitue un véritable « organe métabolique » avec quatre grandes fonctions :

Tableau 2.2 **Phyla et genres bactériens du microbiote intestinal humain.**

Phyla	Genres (espèces principales)
Firmicutes	*Ruminococcus* (*R. albus, R. flavefaciens, R. gnavus, R. torque*) *Coprococcus* (*C. eutactus*) *Anaerotruncus* (*A. colihominis*) *Clostridium* (*C. coccoides, C. hylemonae, C. methylpentosum*) *Eubacterium* (*E. rectale*) *Lactobacillus* *Butyrivibrio* (*B. crossotus*) *Faecalibacterium* (*F. prausnitzii*) *Roseburia* (*R. intestinalis*) *Veillonella* *Streptococcus* *Enterococcus*
Bacteroidetes	*Bacteroides* (*B. uniformis, B. thetaiotaomicron*) *Prevotella* (*P. copri*) *Xylanibacter*
Actinobacteria	*Collinsella* *Atopobium* *Bifidobacterium*
Proteobacteria	*Escherichia* (*E. coli*) *Desulfovibrio* *Helicobacter* (*H. pylori*)
Verrumicrobia	*Akkermansia*

- fonction de protection : les bactéries jouent un rôle de barrière protectrice contre la colonisation et la pullulation d'espèces pathogènes. Certaines d'entre elles peuvent aussi stimuler les défenses innées en induisant la sécrétion de peptides antimicrobiens (par exemple défensines) et d'immunoglobulines (par exemple IgA) ;
- fonction métabolique : les bactéries exercent de nombreux rôles essentiels de dégradation, de transformation et de synthèse, comme la fermentation des polysaccharides complexes (par exemple fibres) avec synthèse des acides gras à courtes chaînes (par exemple butyrate) qui sont une source d'énergie majeure, le métabolisme des protéines, la synthèse des vitamines (par exemple vitamines K et B_{12}, biotine, acide folique, acide pantothénique) et la transformation des acides biliaires et de certains xénobiotiques ;
- fonction de structure et de trophicité : de nombreuses fonctions physiologies sont co-régulées par le microbiote intestinal, comme la maturation de l'épithélium intestinal, la vascularisation des villosités et le renforcement des jonctions cellulaires ;
- fonction immunitaire : le microbiote intestinal est indispensable au développement et au bon fonctionnement du système immunitaire, notamment au niveau du tissu lymphoïde associé au tube digestif (*gut associated lymphoid tissue* [GALT]).

D'autres rôles potentiels ont également été décrits dans la neuromodulation (relation microbiote–intestin–cerveau) et dans la régulation du stockage des graisses. En effet, le microbiote intestinal des individus obèses est plus efficace pour extraire l'énergie à partir d'un régime nutritionnel donné que celui d'individus minces.

Des perturbations de l'équilibre entre microbiote intestinal et hôte (appelées dysbioses) peuvent être associées à différentes pathologies infectieuses ou non. C'est le cas des infections intestinales par ingestion de micro-organismes pathogènes et des diarrhées post-antibiotiques à *Clostridium*

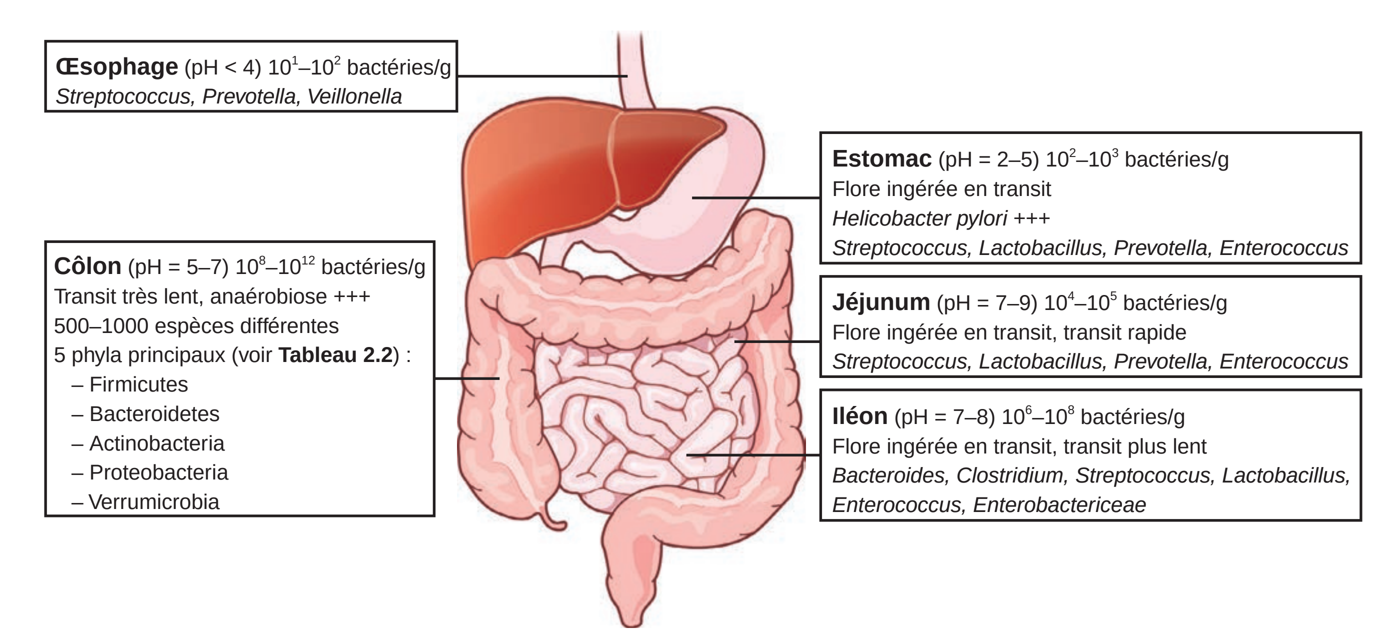


Fig. 2.2 **Caractéristiques physiologiques et microbiotes associés des différentes niches écologiques du tube digestif.**

difficile. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI ; par exemple maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) semblent dues à une réaction inflammatoire inadaptée vis-à-vis du microbiote intestinal qui montre une réduction significative du nombre et de la biodiversité des Firmicutes (rapport Firmicutes/Bacteroidetes de 1–3/1 au lieu de 6/1 chez le sujet sain). Il y a notamment une diminution de *Faecalibacterium prausnitzii* qui aurait des propriétés anti-inflammatoires. Des associations avec le syndrome de l'intestin irritable et certains cancers du tractus digestif (colorectal et gastrique) ont aussi été rapportées. Ces dysbioses peuvent aussi être associées à des maladies extradigestives, comme l'obésité (rapport Firmicutes/Bacteroidetes de l'ordre de 100/1 avec un fort déficit en Bacteroidetes), les maladies cardiovasculaires, les syndromes métaboliques (diabète de type 2 notamment), certaines allergies et l'autisme.

Des modulations thérapeutiques peuvent être employées pour rétablir un microbiote intestinal sain (ou l'eubiose), comme une approche nutritionnelle (modification des apports en fibres fermentescibles) ou l'utilisation de probiotiques, de prébiotiques, voire d'antibiotiques. Un probiotique est défini par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme « un micro-organisme vivant qui, ingéré en quantité suffisante, produit des effets bénéfiques sur la santé de celui qui le consomme ». Les principales espèces utilisées comme probiotiques appartiennent aux genres *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*), *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. infantis*) et *Streptococcus* (*S. thermophilus*). Un prébiotique est un ingrédient non digestible (par exemple fructane, inuline, lactulose) qui a des effets bénéfiques sur la santé en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une bactérie ou population bactérienne spécifique. Enfin, le microbiote intestinal d'un individu sain (alors appelé donneur de selles) peut être utilisé pour le rétablissement du microbiote d'un patient atteint de dysbiose. Ce traitement, appelé transplantation ou greffe de microbiote fécal, est actuellement envisagé pour les infections récurrentes à *C. difficile*.

Microbiote respiratoire

La cavité nasale et le nasopharynx contiennent Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria et Fusobacteria (Fig. 2.1). Au niveau des narines, il y a une prédominance des genres *Corynebacterium*, *Propionibacterium* et *Staphylococcus*, ce qui est similaire au microbiote cutané (voir ci-dessous). À noter que *Streptococcus* et *Moraxella* sont plus abondants chez l'enfant. Concernant *Staphylococcus aureus*, il y a trois modèles de portage nasal chez l'adulte sain : les porteurs permanents (environ 20 %) souvent colonisés par une seule souche sur une longue période ; les porteurs intermittents (environ 30 %) colonisés par différentes souches au cours du temps ; et les non-porteurs (environ 50 %). Les espèces du nasopharynx sont pour la plupart celles retrouvées au niveau des narines (par exemple *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Dolosigranulum*) et de l'oropharynx (par exemple *Streptococcus*). Les pathogènes bien connus peuvent également coloniser les voies aériennes supérieures, comme *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* mais aussi *Neisseria meningitidis*. La capacité de colonisation et la densité de pathogènes potentiels peuvent être modulées par les bactéries commensales. Cela a été vérifié dans le cas de la rhinosinusite chronique où il existe des changements significatifs du microbiote des sinus, notamment avec l'augmentation de l'abondance de *Corynebacterium tuberculostearicum* et une diminution des bactéries résidentes.

Les poumons ont longtemps été considérés comme stériles et le microbiote pulmonaire n'a donc pas initialement été inclus dans le projet HMP (il l'est depuis dans le *Lung HIV Microbiome Project*). Cependant, les méthodes moléculaires ont récemment montré que les poumons d'individus sains non fumeurs étaient peuplés par des communautés bactériennes, certes peu nombreuses mais riches en diversité. À noter que l'étude du microbiote pulmonaire présente des difficultés au niveau méthodologique du fait du risque accru de contamination des prélèvements par les bactéries du microbiote des voies aériennes supérieures. Ainsi, les échantillons ont pour la plupart été obtenus par procédures invasives (lavage bronchoalvéolaire [LBA], prélèvement distal protégé [PDP]), sauf dans le cas de la mucoviscidose où l'expectoration est souvent étudiée.

Les poumons du fœtus sont stériles et leur colonisation débute dès la naissance. Comme au niveau intestinal, le microbiote pulmonaire dépend du mode d'accouchement (voir ci-dessus). Les principaux phyla du microbiote pulmonaire sont similaires à ceux retrouvés au niveau des voies aériennes supérieures : Bacteroidetes, Firmicutes et Proteobacteria (Fig. 2.1). Les genres qui prédominent sont *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella* et *Veillonella*. Ces micro-organismes proviennent très majoritairement des voies aériennes supérieures au cours des phénomènes de micro-aspiration. À noter que des facteurs externes peuvent jouer sur la composition du microbiote pulmonaire comme l'environnement (habitation en campagne, animaux de compagnie, etc.), le tabagisme, l'utilisation de xénobiotiques (antibiotiques, anti-inflammatoires, bronchodilatateurs) et le régime alimentaire. Le rôle du microbiote pulmonaire est principalement lié à la formation et à la maturation du système immunitaire au niveau de la muqueuse respiratoire.

Au cours de la mucoviscidose, les infections respiratoires récurrentes sont traditionnellement dues à *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* et *H. influenzae*, tandis que d'autres pathogènes sont plus rarement retrouvés comme *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia* du complexe *cepacia*. Cependant, l'écologie microbienne des poumons de ces patients est beaucoup plus complexe, que ce soit pendant ou entre les périodes d'exacerbations. Il y a notamment un rapport Firmicutes/Bacteroidetes augmenté et une plus faible biodiversité. Ces études ont également mis en évidence d'autres bactéries pathogènes, soit sous-diagnostiquées comme les anaérobies (dont *Prevotella* spp.), soit nouvelles comme *Lysobacter* spp., *Inquilinus limosus*, *Dialister pneumosintes*, *Dolosigranulum pigrum* et certaines Rickettsiales. Il a aussi été démontré que la diversité bactérienne diminue avec l'âge, la sévérité de l'obstruction bronchique et un moins bon pronostic. Enfin, les patients homozygotes ΔF508 présentent une plus faible diversité que les hétéro-

zygotes ΔF508 et les individus non ΔF508. Une plus faible biodiversité microbienne précède aussi un épisode d'exacerbation. Les antibiotiques systémiques ou inhalés ont aussi une influence négative sur la diversité microbienne. Il existe une association entre un nombre d'infections limitées dans l'enfance et un risque plus élevé d'asthme ou d'allergies. Cela correspond à « l'hypothèse de l'hygiène » dans laquelle une diminution d'exposition aux agents infectieux tôt dans la vie résulte en une modification de l'immunotolérance au niveau des muqueuses. Par exemple, chez l'asthmatique, il y a une augmentation de fréquence des Proteobacteria (notamment *Haemophilus*, *Moraxella* et *Neisseria*) et une diminution de fréquence des Bacteroidetes. Les patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), liée dans 80 à 90 % des cas au tabagisme, présentent une modification de leur microbiote pulmonaire. Comme dans l'asthme, il y a une augmentation relative des Proteobacteria (notamment *Haemophilus* spp.) et une diminution des Bacteroidetes. Comme dans la mucoviscidose, il y a une réduction significative de la biodiversité dans les cas sévères de BPCO, avec une prédominance de *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella* et *Haemophilus*. Chez les patients transplantés, il y a une charge bactérienne plus élevée avec un enrichissement en Proteobacteria (notamment *B. cepacia* complex) et la présence de champignons. Enfin, chez les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le microbiote pulmonaire est enrichi en *Tropheryma whipplei* dont l'abondance relative diminue avec le traitement antirétroviral. Cela suggère que le poumon pourrait constituer la vraie niche écologique de cette espèce.

Microbiote cutané

La peau est un écosystème étendu (d'environ 1,8 m^2) typiquement froid, acide et sec. Elle est constituée d'habitats divers selon son épaisseur, la présence ou non de plis et la densité en structures annexes (c'est-à-dire follicules pileux, glandes sudoripares et glandes sébacées). La partie supérieure de la peau, c'est-à-dire l'épiderme (notamment le *stratum corneum*, composé de kératinocytes) est la première ligne de défense par un effet de barrière physique contre les organismes extérieurs et les substances toxiques. Par l'intermédiaire de son microbiote (environ 10^6 bactéries/cm^2), la peau joue également un rôle important dans l'immunomodulation, notamment via la stimulation permanente du système immunitaire.

La peau du fœtus est stérile mais la colonisation a lieu immédiatement après la naissance. Alors que le microbiote est très différent d'un individu à l'autre, il est relativement stable au cours du temps chez un même individu. Malgré tout, il évolue au cours du temps selon l'âge, le sexe et l'ethnie d'appartenance. À noter qu'au moment de la puberté, il y a des changements significatifs dans la production de sébum (riche en triglycérides) qui est corrélée à des variations en quantités de bactéries lipophiles. Les facteurs environnementaux sont aussi importants, comme les conditions extérieures (température, humidité, ensoleillement), l'hygiène corporelle, la profession, le choix des vêtements et l'utilisation d'antibiotiques ou de cosmétiques. Comme dans l'intestin, la diversité microbienne est beaucoup plus importante qu'initialement envisagée et quatre principaux phyla, composés de milliers d'espèces différentes, sont retrouvés : Actinobacteria (52 %), Firmicutes (24 %), Proteobacteria (16 %) et Bacteroidetes (6 %). Il existe de grandes variations du microbiote cutané selon la localisation anatomique (Fig. 2.1). Les sites « gras » avec une forte densité de glandes sébacées (par exemple visage [front, pli rétro-auriculaire, aile du nez], poitrine, dos) sont à prédominance de micro-organismes lipophiles comme les espèces du genre *Propionibacterium* (notamment *Propionibacterium acnes*), principaux résidents de l'unité pilosébacée. Les sites « humides » (par exemple ombilic, plis inguinaux, plis du genou et du coude, aisselles, plantes des pieds) contiennent principalement *Staphylococcus* spp. (notamment *Staphylococcus epidermidis*) et *Corynebacterium* spp. (par exemple *Corynebacterium jeikeium*), tandis que les *Pseudomonas* spp. sont aussi bien représentés. Les sites « secs » (par exemple fesses, avant-bras, jambes, mains) montrent une diversité plus importante avec une abondance (40 %) de bactéries à Gram négatif (par exemple *Acinetobacter* spp.) suivies des genres *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* et *Staphylococcus*. La diversité bactérienne est généralement moins importante dans les zones « grasses » tandis qu'elle est la plus élevée dans les zones sèches exposées. La grande majorité (50 à 80 %) des champignons sur la peau appartiennent au genre *Malassezia* (*M. globosa*, *M. restricta*, *M. sympodialis*), tandis que des acariens du genre *Demodex* (*D. folliculorum*, *D. brevis*) sont retrouvés au niveau des zones sébacées.

Certaines maladies de la peau sont associées à des modifications du microbiote cutané ; c'est le cas de l'acné vulgaire (*P. acnes*), de la dermatite atopique (*S. aureus*, virus), du psoriasis (Firmicutes-Actinobacteria), de la rosacée (*Demodex*) et de la dermatite séborrhéique (*Malassezia* spp.). Enfin, les bactéries commensales de la peau peuvent aussi devenir des pathogènes opportunistes, comme *S. epidermidis* qui peut être responsable d'infections chez l'immunodéprimé ou sur matériel, notamment grâce à sa capacité de production de biofilms.

Microbiote vaginal

Le microbiote vaginal a un rôle important de protection contre les infections génito-urinaires. Sa composition varie en fonction de l'âge, du pH, du taux d'imprégnation hormonale, de l'activité sexuelle et de l'hygiène corporelle. Des changements ont aussi lieu durant le cycle menstruel et la grossesse. Le microbiote vaginal chez la femme préménopausée est généralement limité en termes de diversité microbienne, étant essentiellement constitué de lactobacilles (notamment *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* et *L. iners*), historiquement désignés sous le nom de bacilles de Döderlein (Fig. 2.1). Il a récemment été démontré que *L. iners*, très difficile à cultiver, était l'espèce prédominante chez environ 50 % des femmes (et non *L. crispatus*). Ces bactéries lactiques protègent l'hôte de la colonisation par des pathogènes potentiels par différents mécanismes : effet de barrière par forte adhérence à la muqueuse, production d'acide lactique et réduction du pH vaginal (entre 3,5 et 4,5), sécrétion de substances

antimicrobiennes (bactériocines, H_2O_2). En dehors des lactobacilles, les autres bactéries isolées par culture sont *Mobiluncus* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp. et *Mycoplasma hominis*. Par approche métagénomique, cinq types de microbiotes vaginaux ont pu être distingués (avec des différences selon le groupe ethnique), dont quatre avec une prédominance de lactobacilles (environ 75 %) et un cinquième plus diversifié sans prédominance mais contenant des quantités importantes d'anaérobies et avec un pH plus élevé (environ 25 %).

En cas de vaginose bactérienne, il y a une modification du microbiote vaginal avec disparition des lactobacilles (ce qui induit une augmentation du pH > 4,5) et prolifération de bactéries anaérobies de 100 à 1000 fois au-dessus de la normale. Le diagnostic est classiquement fondé sur l'examen direct du frottis vaginal et le score de Nugent, prenant en compte de façon semi-quantitative les différents morphotypes bactériens (*Lactobacillus* spp., *G. vaginalis* et *Mobiluncus* spp.). Les scores de 0 à 3 correspondent à une flore normale (prédominance de lactobacilles), ceux de 4 à 6 sont étiquetés intermédiaires (mélange de morphotypes) et les scores de 7 à 10 indiquent une vaginose bactérienne (absence de lactobacilles et prédominance de *G. vaginalis* et *Mobiluncus* spp.). Cependant, au moins la moitié des cas intermédiaires correspondraient à des réelles vaginoses bactériennes. Traditionnellement, la culture a mis en évidence plusieurs bactéries associées à la vaginose bactérienne : *G. vaginalis*, *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Mobiluncus* spp. et *M. hominis*. Les approches récentes de biologie moléculaire ont montré l'implication d'autres bactéries anaérobies, comme *Atopobium vaginae*, *Prevotella bivia*, *Sneathia sanguinegens*, *Leptotrichia amnionii*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Megasphaera* type 1 et BVAB-2 (*bacterial vaginosis-associated bacteria 2*). À noter que l'altération du microbiote vaginal au cours de la vaginose bactérienne est associée à un risque plus élevé de co-infection virale. Enfin, il a été montré que le microbiote vaginal est très stable au cours de la grossesse et que son altération (faible abondance de *Lactobacillus* et prédominance de *Gardnerella* et *Ureaplasma*) est associée à un accouchement prématuré. L'issue de la grossesse pourrait ainsi être prédite par les caractéristiques du microbiote vaginal en début de gestation.

Microbiote urinaire

Comme les poumons, l'urine (et donc la vessie) a longtemps été considérée comme stérile du fait des techniques d'approche uniquement fondées sur la culture standard. Cependant, les outils moléculaires ont prouvé que l'urine des individus sains contenait un microbiote unique, composé d'environ 10^2 à 10^4 bactéries par millilitre. En utilisant des méthodes de culture sophistiquées, jusqu'à 80 % des échantillons urinaires (obtenus par cathétérisme transurétral) ont une culture bactérienne positive. Les principales espèces appartiennent aux genres *Lactobacillus* (15 %), *Corynebacterium* (14 %), *Streptococcus* (12 %), *Actinomyces* (7 %) et *Staphylococcus* (7 %), tandis que sont aussi retrouvés *Aerococcus*, *Gardnerella*, *Micrococcus*, *Actinobaculum*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus*. Même s'il y a une prédominance de Firmicutes dans les deux sexes, il y a une différence significative entre hommes et femmes, ces dernières présentant une diversité souvent plus importante avec la présence d'Actinobacteria et de Bacteroidetes (phyla généralement absents chez les hommes) (Fig. 2.1). À noter que certaines bactéries anaérobies strictes ont été exclusivement retrouvées chez les individus de plus de 70 ans : *Jonquetella*, *Parvimonas*, *Proteiniphilum* et *Saccharofermentans*. Le rôle du microbiote urinaire pourrait être multiple : protection contre les pathogènes (effet de barrière, compétition, production de composés antimicrobiens), développement du tractus urinaire (par exemple jonctions épithéliales) et production de neurotransmetteurs, immunomodulation, dégradation de composés toxiques, etc.

Différents facteurs peuvent influencer le microbiote urinaire, comme le régime alimentaire (par exemple apports hydriques importants, consommation de jus de canneberge), la prise d'antibiotiques, le statut hormonal et l'activité sexuelle. Des altérations du microbiote urinaire ont aussi été associées à différentes pathologies urinaires comme la vessie neurogène, la cystite interstitielle et l'incontinence urinaire impérieuse. Des interactions entre le microbiote intestinal et la formation de lithiases rénales ont été mises en évidence. En effet, il existe une corrélation inverse entre la présence de l'espèce *Oxalobacter formigenes* et le développement de calculs rénaux d'oxalate de calcium, cette bactérie paraissant essentielle à la dégradation de l'oxalate au niveau du tube digestif en diminuant son absorption. Enfin, le microbiote urinaire pourrait être impliqué dans la réponse à l'immunothérapie par BCG dans le traitement préventif des rechutes du cancer de la vessie.

Conclusion

La détermination de la composition des différents microbiotes humains et surtout l'élucidation de leurs dynamiques sont capitales dans la compréhension de nombreuses pathologies, qu'elles soient d'origine infectieuse ou non. Cela va notamment à l'encontre des postulats de Koch dont les quatre principes doivent permettre d'établir un lien de causalité entre un agent pathogène et la maladie qu'il provoque. En effet, les microbiotes ont un rôle majeur dans le maintien de la santé (homéostasie) et/ou le développement des maladies. Ces dernières sont liées à des modifications qualitatives et/ou quantitatives des microbiotes (c'est-à-dire dysbioses), restant à déterminer maintenant si elles en sont la cause ou la conséquence. De nombreux facteurs peuvent induire des variations au sein des microbiotes (par exemple âge, sexe, style de vie, régime alimentaire, comorbidités, médications, etc.) et sont à prendre en compte, de même que les interactions des différents micro-organismes (par exemple bactéries et bactériophages) au sein d'une niche écologique donnée. Afin de prévenir certaines pathologies, l'utilisation de thérapeutiques pourra être instaurée, comme la substitution de microbiote, l'utilisation de probiotiques ou prébiotiques ou la phagothérapie.

Pour en savoir plus

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol 2005 ; 43 : 5721–32.

Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. The microbiome of the lung. Transl Res 2012 ; 160 : 258–66.

Chen H, Jiang W. Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease. Front Microbiol 2014 ; 5 : 508.

Cho I, Blaser MJ. The human microbiome : at the interface of health and disease. Nat Rev Genet 2012 ; 13 : 260–70.

Debré P, Le Gall J.Y. Le microbiote intestinal. Bull Acad Nat Med 2014, 198 : 1667–84.

de Steenhuijsen Piters WA, Sanders EA, Bogaert D. Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci 2015 ; 370 : 20140294.

Dickson RP, Erb-Downward JR, Huffnagle GB. The role of the bacterial microbiome in lung disease. Expert Rev Respir Med 2013 ; 7 : 245–57.

DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. Proc Natl Acad Sci U S A 2015 ; 112 : 11060–5.

Doré J, Corthier G. Le microbiote intestinal humain. Gastroenterol Clin Biol 2010 ; 34 : 7–16.

Dunach-Remy C, Sotto A, Lavigne JP. Le microbiote cutané : étude de la diversité microbienne et de son rôle dans la pathogénicité. Rev Fran Lab 2015 ; 45 : 51–8.

Gordon JI, Klaenhammer TR. Rendezvous with our microbes. Proc Natl Acad Sci U S A 2011 ; 108(Suppl 1) : 4513–5.

Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. Nat Rev Microbiol 2011 ; 9 : 244–53.

Grice EA, Segre JA. The human microbiome : our second genome. Annu Rev Genomics Human Genet 2012 ; 13 : 151–70.

Hilt EE, McKinley K, Pearce MM, et al. Urine is not sterile : use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. J Clin Microbiol 2014 ; 52 : 871–6.

Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, et al. Role of the normal gut microbiota. World J Gastroenterol 2013 ; 21 : 8787–803.

Jenkinson HF. Beyond the oral microbiome. Environ Microbiol 2011 ; 13 : 3077–87.

Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, et al. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. Clin Microbiol Rev 2015 ; 28 : 237–64.

Lewis DA, Brown R, Williams J, et al. The human urinary microbiome ; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. Front Cell Infect Microbiol 2013 ; 3 : 41.

Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature 2012 ; 489 : 220–30.

Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome : rethinking health and disease. Annu Rev Microbiol 2012 ; 66 : 371–89.

Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research : a proposal. Microbiome 2015 ; 3 : 31.

Marteau P. Microbiote intestinal. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). Gastro-Entérologie 2013 ; 8 : 1–8 9-000-B-20.

Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. Am J Med Sci 2012 ; 343 : 2–9.

Murillo N, Raoult D. Skin microbiota : overview and role in the skin diseases acne vulgaris and rosacea. Future Microbiol 2013 ; 8 : 209–22.

Schommer NN, Gallo RL. Structure and function of the human skin microbiome. Trends Microbiol 2013 ; 21 : 660–8.

Segal LN, Rom WN, Weiden MD. Lung microbiome for clinicians. Ann Am Thorac Soc 2014 ; 11 : 108–16.

Shipitsyna E, Roos A, Datcu R, et al. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age – sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible ? PLoS One 2013 ; 8 : e60670.

Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. Nat Rev Microbiol 2011 ; 9 : 279–90.

The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature 2012 ; 486 : 207–14.

Versalovic J, Highlander SK, Petrosino JF. The human microbiome. In : Manual of clinical microbiology. 11th ed. Washington, DC : ASM Press ; 2015.

Walter J, Ley R. The human gut microbiome : ecology and recent evolutionary changes. Annu Rev Microbiol 2011 ; 65 : 411–29.

Whiteside SA, Razvi H, Dave S, et al. The microbiome of the urinary tract-a role beyond infection. Nat Rev Urol 2015 ; 12 : 81–90.

Du prélèvement à la caractérisation des souches

P. Lanotte, C. Isnard et al.

PLAN DU CHAPITRE

3.1 Démarche de l'examen bactériologique

P. Lanotte, F. Garnier, L. Mereghetti

Les objectifs de la démarche de l'analyse bactériologique sont divers. Le plus fréquemment, il s'agit pour le laboratoire de mettre en évidence la ou les bactéries responsables d'une infection, d'effectuer une identification précise du ou des pathogènes et de tester sa (leurs) sensibilité(s) aux antibiotiques habituellement actifs sur cette ou ces bactérie(s). Dans certains cas, il s'agit de s'assurer que la bactérie initialement responsable de l'infection pour laquelle un traitement antibiotique a été entrepris est bien éradiquée. Dans d'autres cas, il peut s'agir de rechercher le portage spécifique d'une bactérie en particulier ; on parle alors de dépistage.

Les moyens de diagnostiquer une infection bactérienne sont de deux ordres, les méthodes de diagnostic direct et les méthodes de diagnostic indirect. Les méthodes directes regroupent les techniques qui permettent de mettre en évidence tout ou partie de la bactérie. Les méthodes mettant en évidence les bactéries dans leur intégralité sont fondées principalement sur les techniques de microscopie en absence de coloration (état frais) ou après coloration et sur les techniques de culture sur milieu artificiel. La détection d'antigènes spécifiques de la bactérie ainsi que les méthodes de mise en évidence d'acides nucléiques (ADN ou ARN) spécifiques de la bactérie constituent les autres méthodes de diagnostic direct. Les méthodes de diagnostic indirect correspondent aux techniques de détection d'anticorps développés par l'organisme infecté en réponse à l'agression par la bactérie pathogène. Il s'agit dans ce cas des méthodes de sérodiagnostic. Les méthodes indirectes ne seront pas abordées dans ce chapitre.

Les prélèvements

Les prélèvements permettant de mettre en évidence une bactérie responsable d'une infection dépendent du site anatomique atteint, mais peuvent correspondre à des liquides biologiques dans lesquels la bactérie ou des antigènes bactériens peuvent être détectés.

Les échantillons biologiques sont prélevés dans des flacons stériles puis transmis au laboratoire le plus rapidement possible.

Un élément majeur caractérise les prélèvements lorsqu'ils sont mis en culture. Il s'agit de la présence éventuellement associée d'une flore bactérienne ou d'une contamination par cette même flore lors du prélèvement. Certains prélèvements proviennent de sites normalement stériles (liquide céphalorachidien, liquide articulaire, sang, biopsies, etc.) pour lesquels une contamination est très peu probable si la désinfection cutanée préalable au prélèvement a été correctement exécutée. L'interprétation de ces prélèvements est relativement aisée. Dans d'autres cas, le prélèvement provient d'un site anatomique normalement stérile mais la contamination par une flore endogène est pratiquement obligatoire (par exemple les prélèvements pulmonaires profonds comme les brossages distaux, même s'ils sont protégés). Enfin,

lorsque la bactérie responsable de l'infection est associée à une flore endogène (c'est le cas dans les infections digestives, les infections cutanées, les angines, etc.), la présence de cette flore va interférer inévitablement avec l'isolement de la bactérie, ce qui nécessitera l'utilisation de milieux sélectifs et/ou de milieux d'enrichissement (voir plus loin). Par ailleurs, il est vrai essentiellement dans les infections cutanées, qu'il faut distinguer les prélèvements superficiels et les prélèvements profonds, seuls ces derniers présentant un intérêt médical réel.

Ces prélèvements sont soit de consistance liquide (urine, liquide céphalorachidien, liquides d'épanchement, etc.), soit de consistance solide (sécrétions visqueuses, des tissus, des biopsies, etc.), soit enfin du matériel (chambres implantables, cathéters, redons, drains, matériel prothétique, etc.). Dans le cas des hémocultures, le prélèvement de sang est directement mis dans un flacon de culture dès le prélèvement).

En fonction du type de prélèvement, l'analyse bactériologique sera complétée par une analyse cytologique qui permet d'orienter vers une étiologie bactérienne ou virale en fonction du type de cellules retrouvé.

Schéma de la démarche

La démarche classique de l'analyse effectuée au laboratoire pour la mise en évidence d'une bactérie à partir d'un prélèvement est schématisée Figure 3.1.

Examen microscopique

L'analyse d'un prélèvement effectué dans un but diagnostique est en règle générale une analyse à la fois cytologique et bactériologique. Ainsi, l'examen microscopique est une étape clé dans la démarche diagnostique des infections bactériennes.

Analyse cytologique

Cette analyse cytologique doit répondre à un ou deux objectifs en fonction de la nature de l'échantillon. Il peut s'agir d'une analyse quantitative qui va permettre de répondre en nombre d'éléments figurés par unité de volume (millimètre cube ou microlitre, millilitre). Cette numération est effectuée pour les prélèvements de nature liquide (liquides

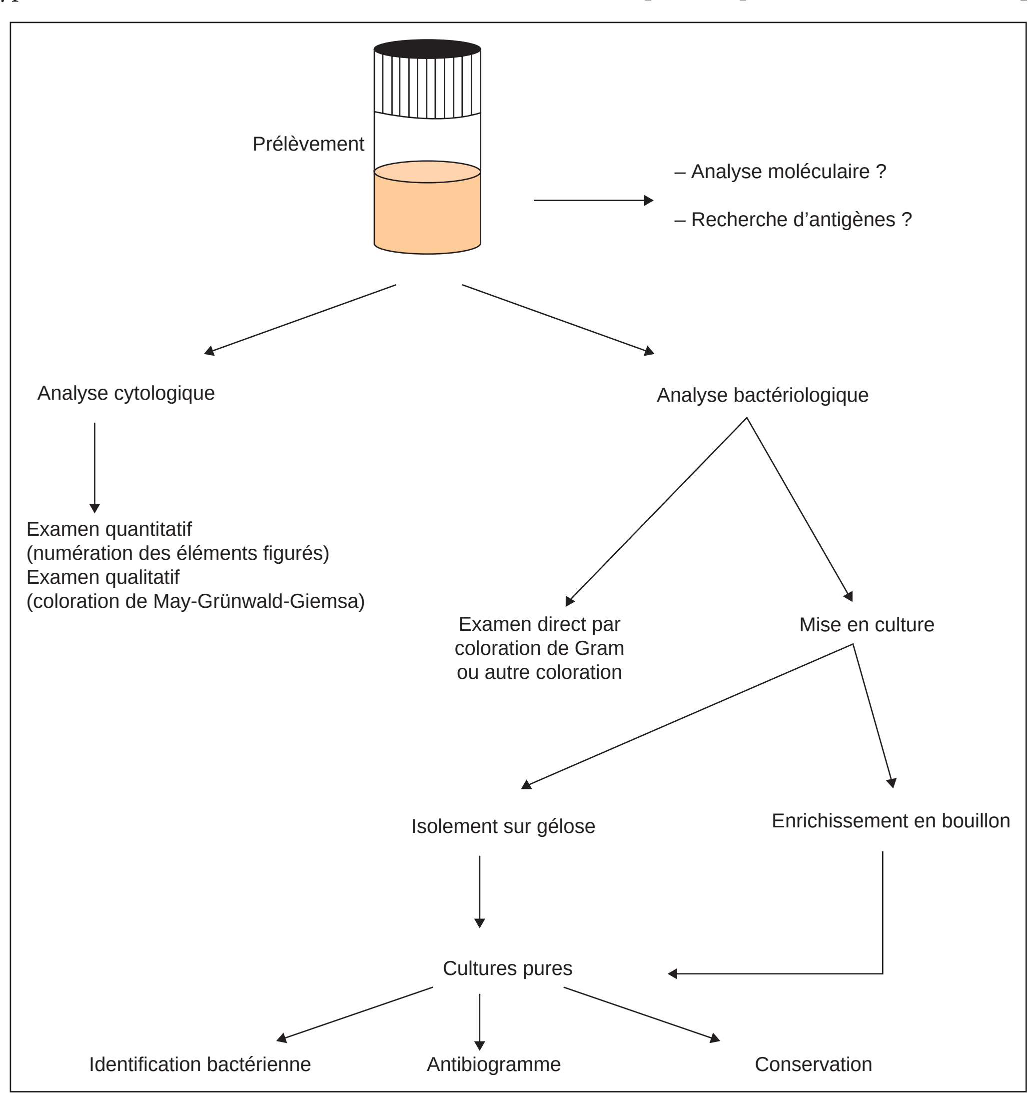


Fig. 3.1 Schéma général de la démarche de l'analyse bactériologique.

céphalorachidiens, urines, liquides articulaires, liquides pleuraux, etc.). Une analyse qualitative précisant la nature des éléments figurés observés sera effectuée sur la plupart des prélèvements précédemment cités lorsqu'une réaction cellulaire aura été mise en évidence. Cette analyse qualitative sera quant à elle également effectuée pour les prélèvements de nature solide (biopsies, tissus, écouvillonnages, etc.). Lorsque des éléments figurés seront présents, la richesse en ces éléments sera évaluée (rares, présence, nombreux) et leur nature sera précisée.

Dans le cas particulier des prélèvements respiratoires, l'appréciation de la qualité du prélèvement sera fondée sur une évaluation quantitative du nombre de leucocytes et de cellules épithéliales par champ microscopique (objectif 10).

Analyse quantitative

La quantification des éléments est effectuée manuellement ou bien plus récemment en utilisant des systèmes automatiques de comptage, en particulier pour les prélèvements d'urine.

Systèmes manuels de comptage

Ces systèmes font appel à des hémocytomètres ou hématimètres communément appelés cellules. Ces cellules sont soit réutilisables comme les cellules de Lemaur ou de Malassez par exemple, soit à usage unique comme les Kovaslide®. Le liquide biologique est analysé directement ou après ajout d'un colorant des noyaux (bleu de toluidine) qui, dans certains cas, permet de faciliter la détection des éléments figurés.

Cellules réutilisables

Les différentes cellules sont constituées de la même façon (Fig. 3.2). Il s'agit d'une épaisse lame porte-objet en verre, quadrillée en son centre qui présente de part et d'autre des plateaux surélevés qui permettent, lorsque ceux-ci reçoivent une lamelle, de définir un volume de liquide défini propre à chaque cellule.

Les cellules utilisées dépendent des habitudes de l'utilisateur ainsi que de la cellularité des milieux étudiés. Pour les milieux riches en cellule, l'hématimètre de Thoma permet l'étude d'un volume de 0,1 µl et la cellule de Malassez, l'étude de 1 µl. Pour des milieux où les éléments figurés sont rares, des volumes plus importants peuvent être analysés; la cellule de Lemaur permet d'étudier jusqu'à 40 µl et celle de Nageotte par exemple jusqu'à 50 µl. Pour des raisons d'hygiène, ces cellules ne sont pratiquement plus utilisées.

Cellules à usage unique

Les cellules à usage unique type Kovaslide® présentent l'avantage de regrouper sur un même support 10 cellules, ce support étant jeté après utilisation sans désinfection comme doivent l'être les cellules précédentes (Fig. 3.3). Le volume étudié est de 1 µl.

Utilisation de systèmes automatiques de comptage

Les systèmes automatiques de comptage utilisent l'urine native avec un volume d'échantillon nécessaire pour l'analyseur voisin de 0,8 à 1 ml. Ces systèmes sont fondés soit sur une coloration des éléments urinaires avec différents colorants fluorescents qui sont ensuite comptés et différenciés par cytométrie en flux, soit par cytométrie en flux avec capture d'images associée à une reconnaissance automatique des particules. Dans ce dernier cas, toutes les particules sont numérisées et mémorisées. Ces systèmes sont connectables au système informatique de laboratoire.

Analyse qualitative

Afin de connaître avec précision la nature des éléments figurés observés lors de l'analyse quantitative, l'étalement du prélèvement avant ou après centrifugation suivi d'une coloration est indispensable. La finesse de l'étalement du frottis est importante pour une observation de qualité. Ce frottis doit être réalisé dans la mesure du possible rapidement après le prélèvement car certains éléments cellulaires se dégradent rapidement, en particulier dans les liquides pauvres en protéines comme les urines ou le liquide céphalorachidien. La fixation des frottis est effectuée en recouvrant de méthanol la préparation jusqu'à évaporation.

Les méthodes de centrifugation douces sont intéressantes pour les liquides contenant peu de cellules, et l'utilisation

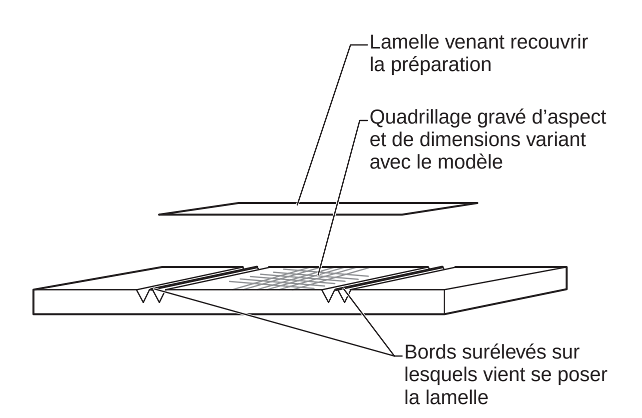


Fig. 3.2 Éléments composant une cellule pour analyse quantitative.

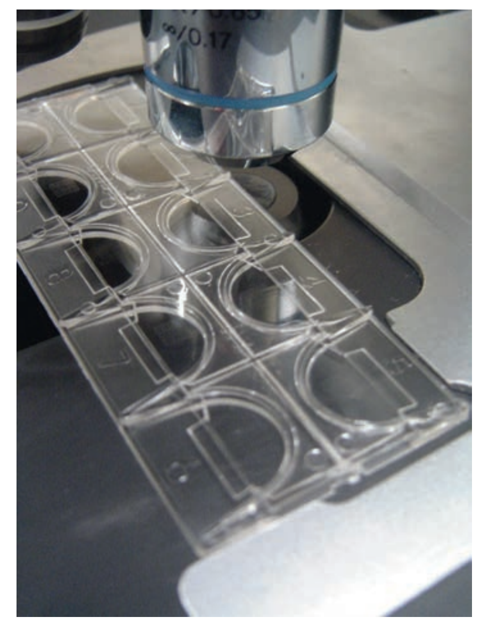


Fig. 3.3 Cellule Kovaslide® sur la platine d'un microscope.

d'une cytocentrifugeuse permet d'obtenir un dépôt cellulaire de très bonne qualité.

La coloration cytologique effectuée est la coloration de May-Grünwald-Giemsa. La méthode classique consiste à déposer sur le frottis préalablement fixé la solution de May-Grünwald et à la laisser agir 5 minutes. Après un lavage à l'eau de 1 minute, la solution de Giemsa est laissée en contact 15 minutes. Après un dernier lavage à l'eau, la préparation est laissée sécher puis observée à l'immersion. Cette coloration permet de colorer les noyaux en bleu, le cytoplasme en rose et les bactéries lorsqu'elles sont présentes en bleu. Il existe des colorations dérivant de la méthode de May-Grünwald Giemsa qui sont plus rapides et permettent d'obtenir un résultat satisfaisant en quelques minutes.

Les frottis réalisés dans ces conditions sont également colorés par la coloration de Gram qui ne permet qu'une observation grossière de la morphologie des cellules.

Examen microscopique bactériologique

L'examen microscopique en bactériologie peut être effectué sans coloration de l'échantillon par observation directe entre lame et lamelle (technique de l'état frais), ou bien après coloration de l'échantillon, ou encore après réaction d'immunofluorescence. Cet examen renseigne sur la présence de bactéries confirmant l'origine bactérienne d'une infection (morphologie, propriétés tinctoriales particulières après coloration de Gram ou coloration de Ziehl-Neelsen), ce qui représente un élément majeur pour une prise en charge thérapeutique adaptée. Ainsi, cet examen oriente sur une famille de bactéries ou un genre bactérien, permettant d'adapter ou de modifier une antibiothérapie. En fonction du prélèvement ou du contexte clinique, il peut dans certains cas, en quelques minutes, identifier de façon quasi certaine un pathogène.

L'examen renseigne également sur la quantité de bactéries présentes dans le prélèvement. Si l'on estime que lors d'une observation à un grossissement de 1000 fois (oculaire de 10 et objectif 100 à l'immersion) le volume observé correspond à 1/1000 de microlitre, alors l'estimation de la quantité de bactéries visibles lors d'un examen direct peut être donnée selon le tableau 3.1.

Tableau 3.1 **Estimation de la quantité de bactérie par ml de prélèvement en fonction de la quantité de bactérie visible au microscope à un grossissement de 1000 fois.**

Nombre de bactéries par champ	Quantité de bactéries par ml
1 bactérie par 100 champs	10^4 bactéries/ml (seuil estimé de sensibilité du microscope optique)
1 bactérie par 10 champs	10^5 bactéries/ml
1 bactérie par 1 champ	10^6 bactéries/ml
10 bactéries par champ	10^7 bactéries/ml
100 bactéries par champ	10^8 bactéries/ml

Examen direct à l'état frais

Les méthodes fondées sur la technique de l'état frais correspondent à l'observation d'un matériel biologique ou d'une suspension bactérienne entre lame et lamelle sans fixation préalable du matériel par la chaleur ou l'alcool.

État frais

Une méthode rapide consiste à observer entre lame et lamelle une suspension bactérienne à l'objectif 40. Les renseignements obtenus par cette observation concernent principalement la mobilité des bactéries. Il faut cependant être prudent sur le fait que des courants de convection dans ces conditions peuvent être présents et perturber l'observation. En fonction de la mobilité observée, si elle est présente, on peut préjuger du type de ciliature de la bactérie (monotriche, péritriche, etc.), ce qui oriente sur la bactérie en cause. Ainsi, par sa mobilité, *P. aeruginosa* par exemple peut se distinguer aisément d'une entérobactérie. Cet examen peut s'avérer très utile lors de la positivité d'une hémoculture. En effet, un doute peut persister sur l'orientation d'identification, après coloration de Gram d'un étalement du bouillon d'hémoculture coloré. Une mobilité importante avec des bacilles qui traversent le champ microscopique est en faveur de *P. aeruginosa* alors qu'une entérobactérie sera mobile sur elle-même dans la majorité des cas.

Certaines bactéries de mobilité caractéristiques sont également repérées par la technique de l'état frais comme les vibrions ou les campylobactéries.

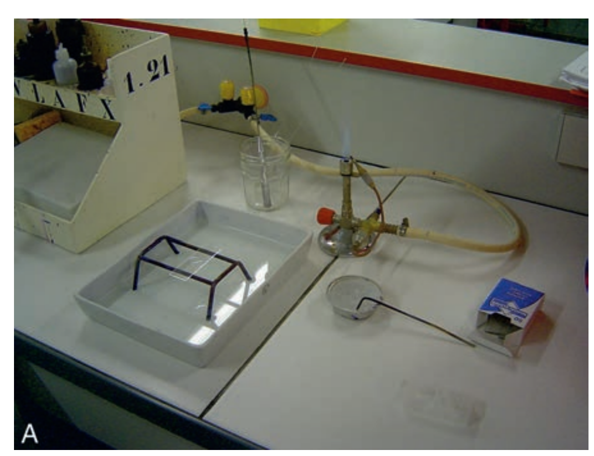
Cet examen peut être effectué après avoir luté la lamelle sur la lame, c'est-à-dire après avoir déposé sur la totalité du pourtour de la lamelle un peu de paraffine préalablement fondue (Fig. 3.4). Cette méthode permet de « sceller » la lamelle et ainsi d'empêcher les courants de convection. Dans ces conditions, une observation à l'immersion peut être effectuée.

État frais pour mise en évidence d'une capsule par méthode à l'encre de Chine

La mise en évidence d'une capsule bactérienne peut être effectuée par coloration « négative », les capsules ne se colorant pas en présence d'encre de Chine. Néanmoins, en pratique quotidienne, cette technique est principalement utilisée pour la mise en évidence de la capsule de *Cryptococcus neoformans*, une levure impliquée dans des infections du système nerveux central chez le patient immunodéprimé, en particulier pour les malades VIH positifs. Un état frais après coloration du produit pathologique prélevé (en l'occurrence le liquide céphalorachidien pour les cryptocoques) peut être réalisé. Une goutte du liquide pathologique et une goutte d'encre de Chine sont déposées côte à côte sur une lame. Une lamelle vient recouvrir les deux gouttes et les deux constituants se mélangent. Lorsque ces levures capsulées sont présentes, elles sont visibles par la présence d'un large halo clair, correspondant à la capsule fongique, autour d'une levure éventuellement bourgeonnante.

État frais sur un microscope à fond noir

Un état frais particulier permet, lorsque le microscope dispose d'un condensateur particulier, d'observer les bactéries



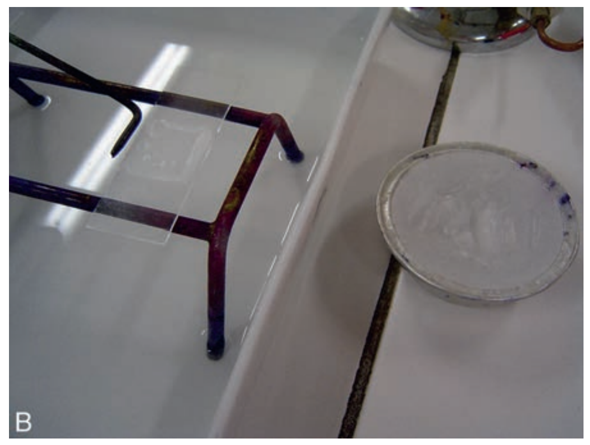




Fig. 3.4 Réalisation de l'état frais après avoir luté la lamelle sur la lame. A. La lame est posée sur un chevalet; la paraffine va être fondue en chauffant au bec Bunsen une tige métallique. **B.** Les quatre côtés de la lamelle vont être scellés par la paraffine. **C.** Observation à l'immersion, objectif ×100, de la préparation.

par contraste. En effet, les rayons lumineux émis par la source d'éclairage sont déviés par réflexion sur un miroir de telle sorte qu'ils ne peuvent pénétrer l'objectif. Lorsqu'un élément est présent sur ce trajet lumineux, il modifie le trajet des rayons lumineux qui se trouvent réfractés et pénètrent dans l'objectif. Les éléments apparaissent brillants sur fond noir. Cette technique est intéressante pour les bactéries mobiles qui sont difficilement colorables par les colorations classiques. Ainsi, les spirochètes et en particulier les tréponèmes et les leptospires (Fig. 3.5) sont facilement repérables à l'aide de cette méthode. Il y a visualisation de la mobilité et présence de spires régulières pour les premiers et mise en évidence d'une mobilité par flexion pour les seconds.

Examen microscopique après coloration

Les techniques les plus communément utilisées au laboratoire de bactériologie médicale font appel à des colorations. La préparation est fixée sur une lame puis colorée. Plusieurs types de coloration existent. Les colorations non différentielles, anciennes, peu utilisées en pratique, colorent toutes les bactéries de la même façon sans distinction, si ce n'est qu'elles permettent de mieux visualiser les morphologies bactériennes et de préciser les agencements des bactéries les unes avec les autres. Les colorations différentielles distinguent les bactéries en fonction de la structure de leur paroi. Deux colorations de référence sont employées : la coloration de Gram distinguant bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif, et la coloration de Ziehl-Neelsen mettant en évidence les bacilles acido-alcoolo-résistants. Certaines colorations spéciales seront ensuite abordées.

Coloration non différentielle – coloration au bleu de méthylène

La coloration au bleu de méthylène est réalisée en faisant couler une solution de bleu de méthylène sur un frottis correctement fixé. Le temps de contact est de 1 minute. La lame est ensuite rincée à l'eau du robinet, séchée entre deux feuilles de papier buvard puis observée à l'immersion. Les structures colorables apparaissent bleues. Néanmoins, cette méthode n'est que peu informative.



Fig. 3.5 Examen direct au microscope à fond noir de *Leptospira interrogans*. *(Photographie Mathieu Picardeau, Unité Biologie des spirochètes, Institut Pasteur.)*

Coloration différentielle

Coloration de Gram

C'est la coloration de référence en bactériologie. Elle est réalisée comme suit et le résultat obtenu à chaque étape est schématisé dans la figure 3.6.

Sur frottis fixé à la chaleur puis à l'alcool (Fig. 3.6A) :

- recouvrir la lame de **violet de gentiane** : 1 minute (Fig. 3.6B) ;
- rejeter le violet de gentiane ;
- recouvrir de **lugol** : 1 minute (Fig. 3.6B) ;
- rejeter le lugol ;
- décolorer à l'**alcool**, la lame étant tenue inclinée. La durée de décoloration à l'alcool est variable selon l'épaisseur du frottis. En pratique, la durée de décoloration est suffisante lorsque ce qui s'écoule en bas de la lame inclinée est devenu clair ;
- stopper la décoloration par un nouveau lavage à l'eau (Fig. 3.6C) ;
- recouvrir la lame de **fuchsine** diluée, 30 secondes à 1 minute ;
- laver à l'eau (Fig. 3.6D) ;
- sécher entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur ;
- examiner à l'immersion.

Les bactéries à Gram positif doivent apparaître colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose (Fig. 3.7). Lorsque la coloration est effectuée à partir d'un produit pathologique contenant des cellules ou des leucocytes, la coloration des noyaux de ces cellules doit apparaître violette et le cytoplasme rose.

Des variantes existent de cette coloration dans lesquelles le violet de gentiane est remplacé par le cristal violet. La décoloration à l'alcool peut être remplacée par une décoloration avec un mélange alcool–acétone. Enfin, la fuchsine peut être remplacée par de la safranine.

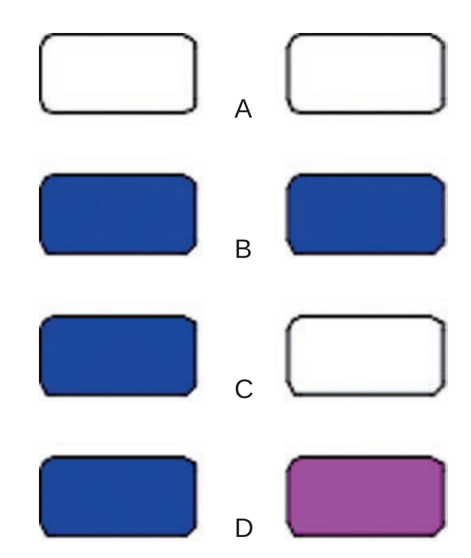


Fig. 3.6 Principe de la coloration de Gram, avec à gauche une bactérie à Gram positif et à droite une bactérie à Gram négatif. **A.** Bactéries fixées non colorées. **B.** Bactéries colorées par le violet de gentiane. **C.** Seules les bactéries à Gram positif restent colorées en violet après l'étape de décoloration. **D.** Les bactéries décolorées à l'étape précédente sont recolorées en rose par la fuchsine.

Des techniques de coloration utilisant des appareils à colorer par spray sont également disponibles. Elles offrent l'avantage de consommer moins de colorant et d'éviter le rejet de colorants sous forme liquide.

Lorsque les prélèvements sont hémorragiques, les nombreuses hématies peuvent gêner l'observation microscopique. Dans ce cas, les frottis sont immergés pendant

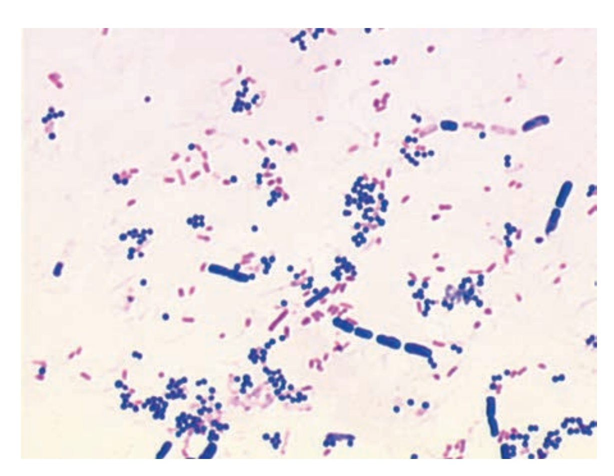


Fig. 3.7 Coloration de Gram appliquée à un mélange de germes (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella* Typhimurium). Observation à l'immersion (×1000).

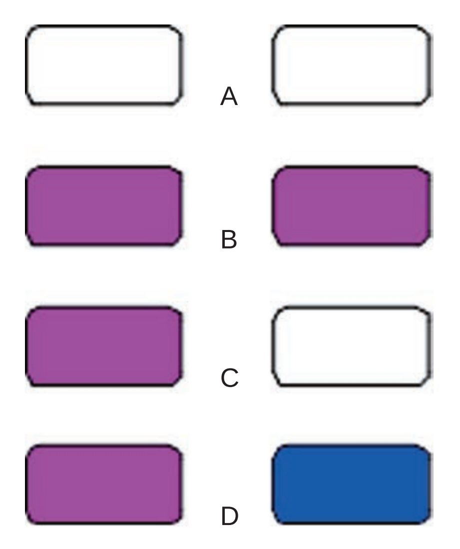


Fig. 3.8 Principe de la coloration de Ziehl-Neelsen, avec à gauche une bactérie acido-alcoolo-résistante (BAAR). **A.** Bactéries fixées non colorées. **B.** Les deux sortes de bactéries sont colorées par la fuchsine. **C.** Seules les BAAR restent colorées en rose après la décoloration. **D.** Les bactéries décolorées à l'étape précédente sont recolorées en bleu par le bleu de méthylène.

5 minutes dans le liquide de Carnoy (24 ml de chloroforme, 8 ml d'acide acétique, alcool éthylique qsp 100 ml).

Coloration de Ziehl-Neelsen, coloration des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR)

C'est la coloration de référence des mycobactéries. Elle est réalisée classiquement comme suit et le résultat obtenu à chaque étape est schématisé dans la figure 3.8. Des variantes de cette méthode existent, en particulier la coloration de Kinyoun et Gabett.

Sur frottis fixé à la chaleur puis à l'alcool méthylique (Fig. 3.8A) :

- recouvrir la lame de **fuchsine** : chauffer par intermittence pendant 10 à 15 minutes, jusqu'à émission de vapeurs (pour la technique à froid, la durée de contact entre la fuchsine et la préparation est de 3 heures) (Fig. 3.8B) ;
- laver à l'eau ;
- décolorer à l'**acide sulfurique** dilué au quart : 1 minute ;
- laver à l'eau ;
- décolorer à l'**alcool** à 95° pendant 10 minutes (Fig. 3.8C) ;
- laver à l'eau ;
- contre colorer au bleu de méthylène pendant 2 minutes (Fig. 3.8D) ;
- laver à l'eau ;
- sécher ;
- examiner à l'immersion.

Les bacilles acido-alcoolo-résistants apparaissent roses sur fond bleu (Fig. 3.9).

Les colorations présentées ici correspondent à des techniques manuelles. Ces techniques sont maintenant largement effectuées à l'aide d'automates de coloration dans les laboratoires de microbiologie qui permettent de standardiser le processus de coloration et de répondre plus facilement aux exigences de l'accréditation. Les principes de coloration restent les mêmes, certains automates utilisant néanmoins des sprays plutôt qu'une coloration par trempage.

Colorations spéciales

Certaines colorations spéciales permettent de mettre en évidence des éléments de la cellule bactérienne comme les flagelles (méthode de Rhodes, Encadré 3.1), les spores bactériennes (méthode de Moeller, Encadré 3.2).

Examen microscopique après réaction d'immunofluorescence

L'immunofluorescence est une méthode qui permet de visualiser les bactéries après étalement d'un prélèvement ou d'une suspension bactérienne sur une lame, séchage et fixation. Un anticorps spécifique de la bactérie, marqué avec une substance fluorescente, en général de l'isothiocyanate de fluorescéine, est mis en contact à 37 °C en chambre humide avec la préparation. Après lavage pour éliminer les anticorps non spécifiquement fixés et séchage, de la glycérine tamponnée est déposée à la surface de la préparation et recouverte d'une lamelle. L'observation est effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence à l'objectif 25 ou 40. Les bactéries apparaissent en vert-jaune.

L'immunofluorescence est dite directe (IFD) lorsque l'immunsérum antibactérien est marqué avec le fluorochrome ; elle est dite indirecte (IFI) lorsque la réaction de révélation utilisant un anticorps marqué est secondaire à

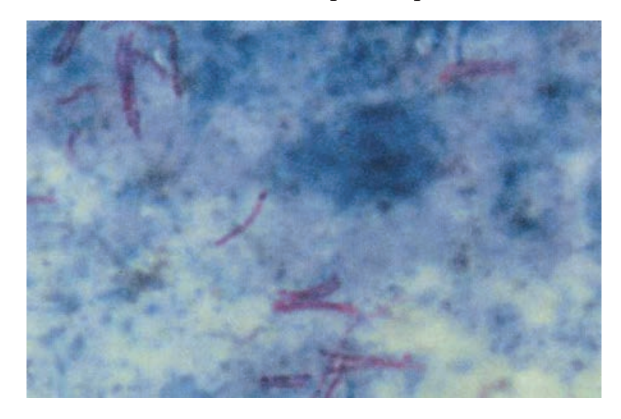


Fig. 3.9 Coloration de Ziehl-Neelsen de *M. tuberculosis* présent dans une expectoration. Observation à l'immersion (×1000).

Encadré 3.1 **Coloration des flagelles par méthode de Rhodes**

À partir d'une suspension d'une culture jeune à peine trouble réalisée en eau déminéralisée, laisser s'écouler une goutte de la suspension sur une lame propre, inclinée à 45° environ selon le sens décrit à la figure A.

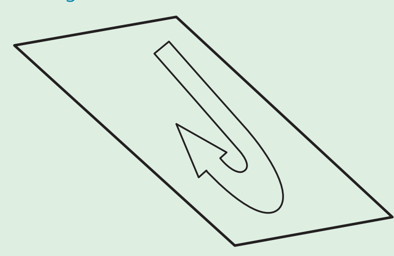


Fig. A **Étalement d'une suspension de germes avant coloration des flagelles.**

La réalisation de cette coloration est décrite ci-après :
- laisser sécher la lame à l'étuve à 37 °C ;
- faire agir le mordant de **Rhodes :** 5 minutes (mordant de Rhodes : tanin, alun de potassium, huile d'aniline, chlorure ferrique) ;
- laver à l'eau distillée ;
- recouvrir de **nitrate d'argent ammoniacal** porté préalablement à ébullition : 5 minutes ;
- laver à l'eau distillée ;
- sécher ;
- examiner à l'immersion.

Les flagelles et les corps bactériens sont colorés en brun-noir (Fig. B).

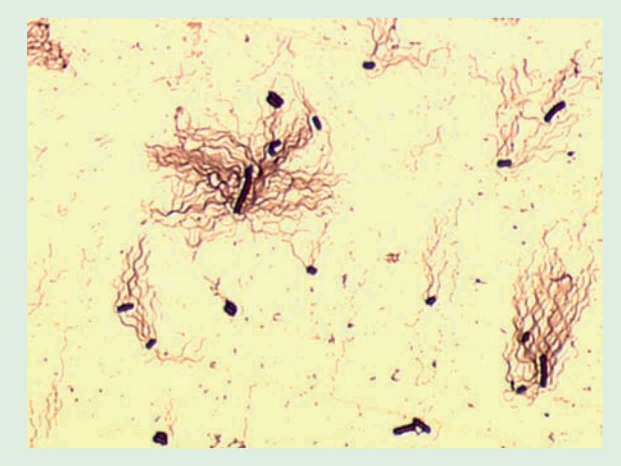


Fig. B **Coloration de Rhodes appliquée à une culture de *Proteus mirabilis*.** Observation à l'immersion (×1000).

Encadré 3.2 **Coloration des spores bactériennes par la méthode de Moeller**

La coloration des spores bactériennes par la méthode de Moeller est effectuée comme suit.
Sur un frottis fixé à la chaleur puis à l'alcool :
- recouvrir d'acide chromique à 5 % : 5 minutes ;
- laver à l'eau ;
- colorer à la **fuchsine à chaud** (60 °C), 3 à 4 émissions de vapeurs : 10 minutes ;
- décolorer à l'alcool absolu rapidement ;
- stopper la décoloration par lavage à l'eau ;
- recolorer au **bleu de méthylène :** 3 minutes ;
- laver à l'eau ;
- sécher ;
- examiner à l'immersion.

Les spores sont rouge-rose, les corps bactériens bleus (Fig. C).

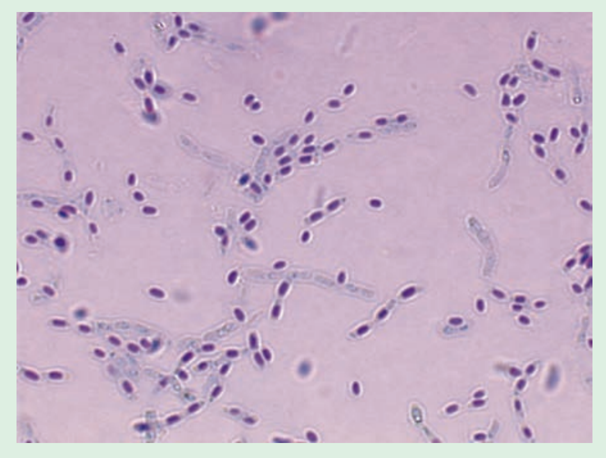


Fig. C **Coloration de Moeller appliquée à une culture de *Bacillus cereus*.** Observation à l'immersion (×1000).

une première étape de réaction antigène–anticorps. Il peut s'agir soit d'un sérodiagnostic par IFI (antigène connu et des anticorps spécifiques de l'antigène sont recherchés dans le sérum d'un patient), soit d'une immunodétection, IFD ou IFI (des anticorps spécifiques d'un antigène bactérien sont utilisés pour repérer cet antigène dans un produit pathologique ou une suspension de germes).

Les applications de cette méthode concernaient entre autres *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia* et les mycoplasmes. Ces méthodes tendent à disparaître compte tenu de l'avènement des techniques de biologie moléculaire et du fait d'une spécificité relative des anticorps utilisés.

Culture et isolement des bactéries

Les bactéries d'intérêt médical les plus fréquemment responsables d'infection arrivent à se développer sur des milieux de culture. Ces milieux de culture sont indispensables à la multiplication bactérienne, ce qui permet par la suite une identification bactérienne ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques lorsque la bactérie est isolée en culture pure.

Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés en bactériologie doivent contenir les éléments nécessaires à la survie et à la multiplication des bactéries et doivent posséder les propriétés physicochimiques convenant à cette culture (pH en particulier). Les milieux sont de différents types. Il s'agit soit de milieux

de base, permettant la croissance d'espèces non ou peu exigeantes, soit de milieux enrichis par l'addition de diverses substances (sérum, œuf, sang, vitamines, etc.) qui autorisent la croissance de bactéries plus exigeantes. Il peut s'agir également de milieux rendus sélectifs par addition d'antibiotiques, d'antiseptiques ou de colorants qui vont inhiber les bactéries sensibles à ces composés.

Milieux de base

Le milieu liquide de base est représenté par le bouillon nutritif ordinaire qui est composé de trois composants principaux, les peptones, les extraits de viande et les extraits de levure. Les peptones sont des hydrolysats enzymatiques de protéines animales ou végétales riches en acides aminés et en petits peptides. En fonction des enzymes utilisées, les compositions des peptones et leurs propriétés sont différentes. Les extraits de viande apportent des sels minéraux, des vitamines, des protéines peu dégradées et des glucides. Les extraits de levure, quant à eux, représentent une source d'acides aminés et de vitamines hydrosolubles. Du chlorure de sodium est habituellement ajouté à la concentration de 5 g/l.

Les milieux se présentent sous forme liquide ou sous forme solide. Par addition dans les milieux liquides d'un agent solidifiant, on obtient des milieux solides appelés communément gélose. En effet, l'agent le plus souvent utilisé est l'agar-agar (agar ou gélose) qui est un polysaccharide complexe provenant d'algues marines. Cette substance permet, à des concentrations de 15 à 20 g/l, de solidifier les milieux liquides. Cette gélose fond à 80 °C, reste en surfusion à des températures voisines de 50 °C et se solidifie à des températures inférieures. D'autres agents solidifiants peuvent être utilisés, comme les œufs coagulés dans le milieu de Löwenstein-Jensen utilisé pour la recherche des mycobactéries et le sérum coagulé pour le milieu de Loeffler utilisé pour la recherche du bacille de la diphtérie.

Les milieux sont commercialisés soit sous forme de poudres déshydratées, soit prêts à l'emploi en tube ou en boîte de Petri. Pour les poudres déshydratées, les milieux doivent être reconstitués selon les instructions du fabricant et doivent être autoclavés avant utilisation, sauf dans certains cas lorsque les milieux contiennent des composés thermolabiles. Les milieux prêts à l'emploi présentent l'avantage d'être de qualité constante et de garantir la croissance d'un certain nombre de bactéries testées avant mise sur le marché des lots fabriqués, cela bien évidemment sous condition d'avoir été stockés selon les recommandations du fabricant et d'être utilisés dans leur période de validité.

Milieux d'enrichissement

Ces milieux permettent de favoriser une croissance bactérienne à partir de prélèvements paucimicrobiens. Il s'agit en général de milieux liquides riches permettant la multiplication d'un maximum de bactéries, y compris des milieux permettant le développement de bactéries anaérobies strictes. Parmi les plus utilisés, le bouillon nutritif, le milieu de Schaedler, le milieu cœur-cerveau (*brain-heart infusion* [BHI]), le milieu de Rosenow. Des milieux d'enrichissement peuvent également être utilisés pour favoriser le développement de certaines bactéries de façon préférentielle aux bactéries présentes dans des flores. Il s'agit dans ce cas de milieux d'enrichissement sélectifs. Ainsi, la recherche par exemple de bactéries entéropathogènes dans les coprocultures utilise ces milieux (milieu de Muller-Kauffmann, eau peptonée alcaline, etc.). Le milieu de Muller-Kauffmann ou bouillon de base au tétrathionate est un milieu d'enrichissement sélectif pour les salmonelles contenant de la bile et du vert brillant.

La composition des milieux de culture est présentée dans l'Encadré 3.3.

Milieux d'isolement

Les milieux d'isolement, contrairement aux précédents, sont des milieux solides qui permettent d'obtenir des colonies isolées permettant d'effectuer les tests d'identification ou d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des bactéries d'intérêt médical. Seules les géloses les plus couramment utilisées seront abordées.

Géloses de base

Ces géloses sont constituées par les géloses nutritives ordinaires, les géloses tryptone soja (ou trypticase soja). Ces milieux permettent la culture des bactéries non exigeantes (Encadré 3.3). La gélose de base Columbia est un milieu hautement nutritif permettant la culture des germes exigeants.

La gélose CLED (cystine-lactose-électrolyte déficient) est un milieu recommandé pour l'analyse bactériologique des urines. Ce milieu permet la croissance et l'isolement de la plupart des bactéries responsables d'infections urinaires. La déficience en électrolytes s'accompagne d'une absence de mobilité des *Proteus*.

Géloses enrichies

Géloses au sang frais

Les géloses au sang frais, en général sang de mouton ou de cheval, sont obtenues en ajoutant à des géloses ordinaires du sang frais dans des proportions de 5 à 10 % en volume. Ce sont des géloses qui permettent la croissance des bactéries exigeantes grâce à la présence de facteurs de croissance contenus dans le sang. En fonction de l'origine des hématies, le caractère hémolytique des bactéries peut varier. Les géloses au sang sont en général fabriquées soit à partir de géloses TS additionnées de sang de cheval (gélose TSH, pour *tryptone-soja-horse blood*), soit à partir de gélose de base Columbia, plus riches, additionnées de sang de mouton (gélose SBA, pour *sheep-blood-agar*).

Géloses au sang cuit

Les géloses au sang cuit, appelées géloses « chocolat », permettent de libérer par la cuisson des facteurs de croissance supplémentaires. Néanmoins, ces géloses sont souvent supplémentées en vitamines (par exemple gélose chocolat Polyvitex®). Elles permettent la croissance des bactéries exigeantes, en particulier celles du genre *Haemophilus*.

Géloses sélectives

Pour *Bordetella pertussis*

Les milieux de Bordet-Gengou ou les géloses au charbon contenant de l'acide nicotinique, supplémenté de 10 % de sang de cheval défibriné (v/v), sont rendus sélectifs par addition de céfalexine à 40 µg/ml.

Encadré 3.3 Composition des principaux milieux de culture

Bouillon nutritif

- Extrait de viande de bœuf 1 g/l
- Extrait de levure 2 g/l
- Peptone 5 g/l
- Chlorure de sodium 5 g/l
- pH 7,4 ± 0,2

Bouillon cœur-cervelle

- Infusion de cervelle de veau 12,5 g/l
- Infusion de cœur de bœuf 5 g/l
- Protéose–peptone 10 g/l
- Glucose 2 g/l
- Chlorure de sodium 5 g/l
- Phosphate disodique 2,5 g/l
- pH 7,4 ± 0,2

Bouillon de Schaedler

- Bouillon tryptone soja 10 g/l
- Peptone spéciale 5 g/l
- Extrait de levure 5 g/l
- Glucose 5 g/l
- Chlorhydrate de cystéine 0,4 g/l
- Hémine 0,01 g/l
- Tampon Tris 0,75 g/l
- pH 7,4 ± 0,2

Gélose nutritive ordinaire

- Extrait de viande de bœuf 1 g/l
- Extrait de levure 2 g/l
- Peptone 5 g/l
- Chlorure de sodium 5 g/l
- Agar 15 g/l
- pH 7,4 ± 0,2

Gélose tryptone soja (TS)

- Tryptone (hydrolysat trypsique de caséine) 15 g/l
- Peptone de soja 5 g/l
- Chlorure de sodium 5 g/l
- Agar 15 g/l
- pH 7,3 ± 0,2

Gélose de base Columbia

- Peptone (hydrolysat pepsique de viande) 23 g/l
- Amidon 1 g/l
- Chlorure de sodium 5 g/l
- Agar 10 g/l
- pH 7,3 ± 0,2

Gélose CLED (cystine-lactose-électrolyte déficient)

- Peptone 4 g/l
- Extrait de viande de bœuf 3 g/l
- Tryptone 4 g/l
- Lactose 10 g/l
- L-cystine 0,128 g/l
- Bleu de bromothymol 0,02 g/l
- Agar 15 g/l
- pH 7,3 ± 0,2

Gélose de Mueller-Hinton (MH)

- Infusion de viande de bœuf 300 g/l
- Hydrolysat de caséine 17,5 g/l
- Amidon 1,5 g/l
- Agar 17 g/l
- pH 7,4 ± 0,2

Gélose HTM (*Haemophilus Test Medium*)

- Gélose de Mueller-Hinton 38 g/l
- Extrait de levure 5 g/l
- pH 7,4 ± 0,2

Ce milieu est supplémenté en hémine et en NAD, indispensables à la croissance de *H. influenzae*.

Gélose de Wilkins-Chalgren

- Tryptone 10 g/l
- Peptone de gélatine 10 g/l
- Extrait de levure 5 g/l
- Glucose 1 g/l
- Chlorure de sodium 5 g/l
- L-arginine 1 g/l
- Pyruvate de sodium 1 g/l
- Ménadione 0,0005 g/l
- Hémine 0,005 g/l
- Agar 10 g/l
- pH 7,1 ± 0,2

Pour *Brucella*

La gélose de base Columbia ou la gélose de base pour *Brucella* additionnées de 5 à 10 % (v/v) de sérum de cheval décomplémenté et 1 % (m/v) de glucose sont rendues sélectives par addition d'antibiotiques (polymyxine B, bacitracine, acide nalidixique, nystatine, vancomycine).

Pour campylobactéries

Un grand nombre de milieux de culture sélectifs ont été développés pour permettre la croissance des campylobactéries à partir des selles, notamment pour inhiber la flore fécale. De plus, ces bactéries présentent des exigences variables en fonction des espèces en termes d'atmosphère et de température pour une culture optimale. Les géloses de base sont variables en fonction des milieux (Columbia éventuellement associée à du charbon activé), et les suppléments antibiotiques qui vont rendre sélectif le milieu sont également divers (vancomycine, polymyxine, triméthoprime pour le milieu de Skirrow ; bacitracine, colistine, céfazoline, novobiocine, cycloheximide ou amphotéricine B pour le milieu de Butzler ; pyruvate de sodium, céfopérazone, vancomycine, cycloheximide pour le milieu de Karmali).

Pour isolement de *Clostridium difficile*

La gélose de base est rendue sélective par ajout de cyclosérine, de cefoxitine.

Pour isolement de *Corynebacterium diphtheriae*

La gélose de Tinsdale est une gélose de base contenant de la cystine supplémentée en sérum de bœuf, en tellurite de potassium et en thiosulfate de sodium. Les colonies sont noires, petites avec un halo marron-noir après 24 heures d'incubation.

Pour isolement d'*Escherichia coli* O157:H7

Le milieu utilisé est le milieu de MacConkey au sorbitol (SMAC). Ce milieu est sélectif par la présence de sels biliaires et différentiel par le remplacement du lactose du MacConkey standard par du sorbitol pour la recherche d'*E. coli* O157:H7. En effet, cet *E. coli* ne fermente habituellement pas le sorbitol à la différence des autres *E. coli*. Les colonies apparaissent incolores, alors que les colonies de bactéries fermentant le sorbitol sont roses.

Pour les légionelles

Le milieu de base pour la recherche des légionelles est composé de charbon activé et d'extrait de levure. Il est supplémenté avec un tampon ACES/hydroxyde de potassium, du pyrophosphate ferrique, de la L-cystéine et du cétoglutarate dans le milieu BCYE, et peut être rendu sélectif par l'ajout de glycine, vancomycine, polymyxine, cycloheximide.

Pour les *Neisseria* pathogènes

Plusieurs associations d'antibiotiques permettent de rendre sélectif pour les gonocoques et méningocoques des géloses enrichies. Les associations VCN (vancomycine, colistine, nystatine), VCNT (vancomycine, colistine, nystatine, triméthoprime), VCAT (vancomycine, colistine, amphothéricine B, triméthoprime).

Pour *Pseudomonas*

Les géloses de base sont rendues sélectives par addition de cétrimide éventuellement associé à l'acide nalidixique.

Pour *Salmonella* et *Shigella*

Des milieux sélectifs pour l'isolement des *Salmonella* et des *Shigella* sont disponibles.

- La gélose Hektoen contient des sels biliaires, un taux élevé de peptone pour compenser l'effet inhibiteur de sels biliaires sur les shigelles, une quantité importante (12 g/l) de lactose pour une mise en évidence précoce des bactéries fermentant le lactose, du thiosulfate et du citrate ferrique permettant de détecter les bactéries H_2S positives. Ainsi, sur ce milieu, les shigelles forment des colonies vertes et les salmonelles des colonies bleu-vert avec ou sans centre noir.
- Le milieu *Salmonella-Shigella* contient du rouge neutre comme indicateur de pH et du vert brillant comme inhibiteur supplémentaire. Les bactéries ne fermentant pas le lactose donnent des colonies roses, celles H_2S positives en plus un centre noir.
- La gélose XLD (xylose, lysine, désoxycholate) est fondée sur la fermentation du xylose (les shigelles ne fermentent pas le xylose), la décarboxylation de la lysine (salmonelles et shigelles possèdent une lysine décarboxylase) et la production d'H_2S.

Pour isolement des staphylocoques

Le milieu de Chapman est un milieu au mannitol, hypersalé (75 g/l de chlorure de sodium), qui est sélectif pour les staphylocoques à l'exception de quelques espèces halophiles appartenant à d'autres genres bactériens.

Pour isolement de *S. aureus*, des streptocoques hémolytiques et des entérocoques

La gélose Columbia ANC (acide nalidixique-colistine) est une gélose de base Columbia rendue sélective par addition d'acide nalidixique et de sulfate de colistine. Elle est en particulier utilisée à partir de prélèvements rhinopharyngés.

Pour isolement de *Streptococcus agalactiae*

Les géloses Granada contiennent de l'amidon et du sérum qui favorisent la production du granadaène par la bactérie qui est un pigment de couleur orangée (Fig. 3.10). Ces géloses sont incubées en anaérobiose à 37 °C et il est recommandé de les observer après 48 heures d'incubation.

Pour isolement de *Yersinia enterocolitica*

Le milieu de Schiemann CIN (cefsulodine-irgasan-novobiocine) est un milieu sélectif pour *Yersinia enterocolitica.* À la gélose de base est additionnée de la cefsulodine, de l'irgasan et de la novobiocine.

Géloses chromogènes pour identification présomptive

Les milieux chromogènes sont des milieux gélosés solides permettant, grâce à la mise en évidence d'activité enzymatique, l'identification directe de certaines espèces bactériennes, ou l'orientation vers certains groupes de bactéries. Ce sont des milieux gélosés non sélectifs adaptés à l'isolement, l'identification et à la numération des germes urinaires. Les chromogènes sont des substrats artificiels incolores directement incorporés dans la gélose, qui libèrent des composés de couleurs différentes après dégradation par leurs enzymes respectives, directement visibles. Il existe de nombreux milieux chromogènes qui permettent l'isolement et la numération des germes, en particulier ceux responsables d'infections du tractus urinaire afin de faciliter l'identification des germes les plus fréquemment impliqués.

Milieux chromogènes utilisés dans le diagnostic des infections urinaires

À titre d'exemple, quatre milieux sont présentés : le milieu CHROMagar Orientation® (Becton Dickinson), le milieu CPS ID 3® (bioMérieux), le milieu UriSelect 4® (Bio Rad) et le milieu UTI® (Oxoid). Les propriétés des quatre milieux chromogènes utilisés pour l'identification sont présentées dans le tableau 3.2.

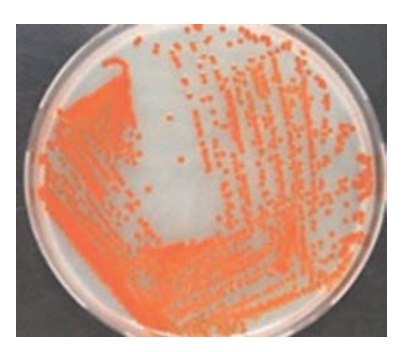


Fig. 3.10 Exemple de colonies de *S. agalactiae* sur milieu Granada.

Tableau 3.2 **Interprétation des résultats obtenus en fonction des bactéries pour quatre milieux chromogènes.**

	CHROMagar Orientation® (BD)	CPS ID 3® (bioMérieux)	UriSelect 4® (Biorad)	UTI® (Oxoid)
Escherichia coli (bêta-galactosidase +)	Colonies roses	Colonies roses à bordeaux	Colonies rose à pourpre Confirmation obligatoire par une recherche d'indole ; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif. Indole + = *E. coli.* Indole – = identification par méthode classique	Colonies roses Confirmation obligatoire par une recherche d'indole ; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif. Indole + = *E. coli* Indole – = identification par méthode classique
Enterococcus sp. (bêta-glucosidase +)	Colonies bleu-vert à turquoise de petite taille	Colonies bleu à turquoise de petite taille et l'examen microscopique montrant des cocci. N.B. : si une des conditions n'est pas remplie, identifier le germe par la méthode classique	Colonies bleu-turquoise franc, brillant, de petite taille, et l'examen microscopique montrant des cocci N.B. : si une des conditions n'est pas remplie, identifier le germe par la méthode classique	Colonies bleu turquoise
Proteus sp. (tryptophane désaminase +)	Colonies beige avec un halo brun	Colonies brunes à marron Effectuer une recherche d'indole ; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif Indole – = *P. mirabilis* Indole + = *P.* indologène, *Morganella* ou *Providencia* ; identifier précisément par une méthode classique	Colonies brun orangé Effectuer une recherche d'indole ; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif. Indole – = *P. mirabilis* Indole + = *P.* indologène, *Morganella* ou *Providencia* ; identifier précisément par une méthode classique	Colonies brun beige Effectuer une recherche d'indole ; déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Virage au rose si positif. Indole – = *P. mirabilis* Indole + = *P.* indologène, *Morganella* ou *Providencia* ; identifier précisément par une méthode classique
Groupe *Klebsiella – Enterobacter – Serratia – Citrobacter* (bêta-galactosidase + et bêta-glucosidase +)	Colonies bleu métallique avec ou sans halo rose, de grande taille	Colonies vertes à brun vert, de grande taille et examen direct montrant des bacilles Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies bleu-violet, de grande taille et examen microscopique montrant des bacilles Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies bleu-pourpre, de grande taille Poursuivre l'identification par une méthode classique
Staphylococcus saprophyticus	Colonies rose pâle, opaques, de petite taille	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique
Autres bactéries	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique	Colonies blanches Poursuivre l'identification par une méthode classique

Ces milieux contiennent à partir d'une gélose de base des mélanges chromogènes permettant de détecter des enzymes produites par les bactéries comme des bêta-glucosidases, des bêta-D galactosidases. Le milieu contenant du tryptophane et de la phénylalanine, en présence de tryptophane désaminase, les colonies sont brunes.

Certains de ces milieux sont translucides ; c'est le cas des milieux BD CHROMagar Orientation® (Becton Dickinson) et CPS ID 3® (bioMérieux). D'autres sont opaques comme le milieu UriSelect 4® (Bio Rad) et le milieu UTI® (Oxoid).

Escherichia coli

L'activité bêta-galactosidase donne des colonies rose à pourpre, plus ou moins translucides sur les quatre milieux (Fig. 3.11). Une confirmation par la recherche de la production d'indole est recommandée. Pour réaliser ce test, il suffit de déposer une colonie sur un papier préalablement imbibé de réactif de Kovacs. Un virage au rose est observé pour les bactéries indole positives (*E. coli*). En cas de réaction négative, il est nécessaire de poursuivre l'identification par une méthode classique.

Enterococcus spp.

Les colonies sont de petite taille et l'activité bêta-glucosidase se traduit par une coloration bleu turquoise à bleu-vert selon les quatre milieux (Fig. 3.12).

L'association de l'examen microscopique montrant des cocci à Gram positif en chaînette permet de confirmer le



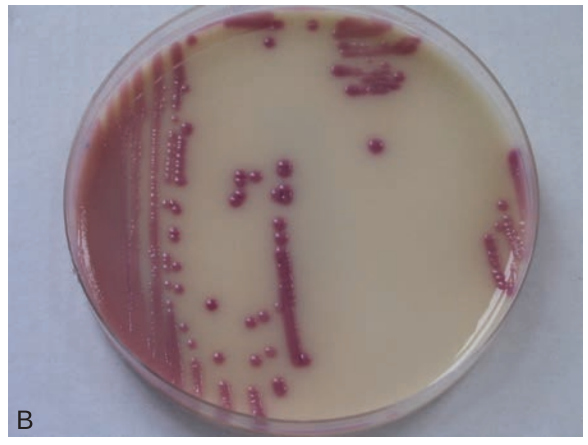
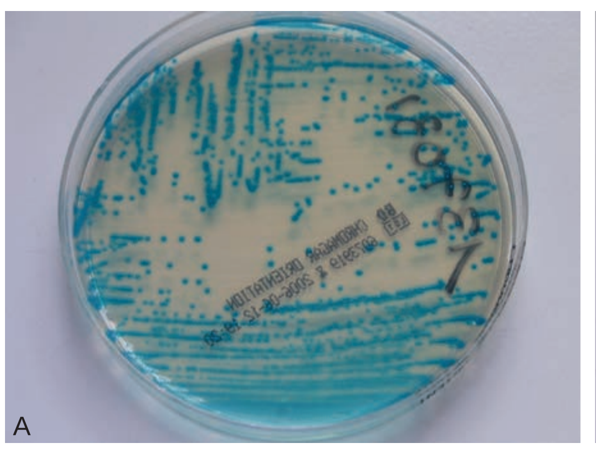


Fig. 3.11 Résultat d'une culture d'*E. coli* sur CPS ID3® (bioMérieux) à gauche et sur milieu UTI® (Oxoid) à droite.



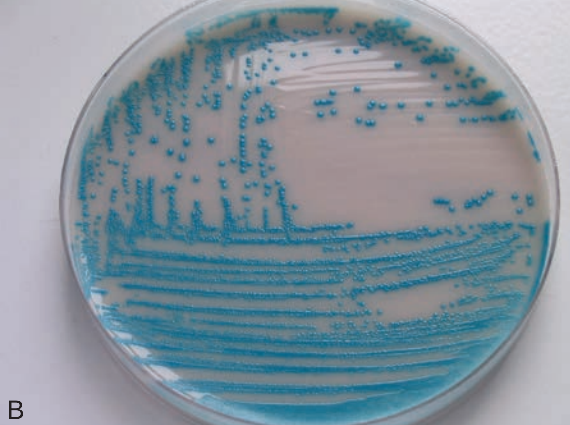


Fig. 3.12 Résultat d'une culture d'*Enterococcus faecalis* sur CHROMagar® Orientation (BD) à gauche et sur milieu Uriselect® (Biorad) à droite.

genre. Pour le milieu UTI®, une étape supplémentaire est recommandée qui est la réalisation d'un test PYR, mettant en évidence l'hydrolyse du pyroglutamate, afin de différencier les entérocoques (test PYR négatif) des streptocoques spp. (test PYR positif).

Proteus, Morganella, Providencia

L'activité tryptophane désaminase (TDA) est détectée par la production d'un pigment brun diffusible : des colonies beiges à brun orangé, avec ou sans brunissement de la gélose sont obtenues (Fig. 3.13).

La recherche de la production d'indole qui orientera vers les *Proteus* indologènes (indole positif) ou vers *Proteus mirabilis* (indole négatif) sera effectuée.

Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter

Les colonies sont de grande taille et l'activité bêta-glucosidase donne une coloration bleu franc intense sur CHROMagar Orientation®, UriSelect 4®, UTI® et bleu-vert sur CPS ID 3®. La mise en évidence de bacilles à Gram négatif à l'examen microscopique donne une forte présomption de bactérie appartenant à ce groupe. L'identification par une méthode classique sera poursuivie.

Autres milieux chromogènes

La plupart des fabricants de milieux gélosés ont développé des milieux chromogènes pour un nombre important de bactéries dans des circonstances particulières. Il s'agit notamment du dépistage du portage génital de *Streptococcus agalactiae* chez les femmes enceintes (différent du milieu Granada qui n'est pas un milieu chromogène proprement dit), du dépistage du portage nasal de *S. aureus* résistant à l'oxacilline et du dépistage des bactéries multirésistantes (dépistage des entérobactéries porteuses de bêta-lactamases à spectre étendu par exemple). Des milieux chromogènes utiles pour la détection des salmonelles dans une coproculture sont également disponibles.

Géloses pour étude de la sensibilité aux antibiotiques

Selon les dernières recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM 2015) (www.sfm-microbiologie.org/page/page/showpage/page_id/90.html), les antibiogrammes doivent être effectués pour la diffusion en milieu gélosé et la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par microdilution en milieu liquide sur milieu Mueller-Hinton (MH) ou sur MH au sang de cheval défibriné et additionnée de

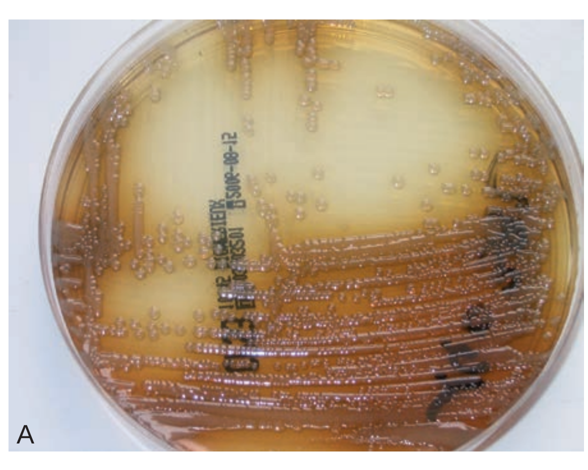




Fig. 3.13 Résultat d'une culture de *Proteus mirabilis* sur CPS ID3® (bioMérieux) à gauche et sur milieu UTI (Oxoid) à droite.

20 mg/l de β-NAD (MH-F). La gélose MH est employée lors de la méthode de diffusion en gélose pour les bactéries autres que celles à croissance lente. La gélose MH-F additionnée de 5 % de sang de cheval défibriné mécaniquement et de 20 mg/l de β-NAD est employée pour *Streptococcus* spp., dont *S. pneumoniae*, *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Pasteurella multocida*, *Corynebacterium* et autres bactéries à croissance lente. Pour *Helicobacter pylori*, il est recommandé d'utiliser une gélose de MH additionnée de 10 % de sang de cheval.

Pour les gonocoques, méningocoques, bactéries anaérobies et certaines autres espèces, le CA-SFM/EUCAST propose les données et la méthodologie du CA-SFM 2013.

Méthodes d'isolement

En fonction de la présentation des milieux et de leur utilisation, les méthodes d'ensemencement diffèrent.

Ensemencement des milieux solides en boîte de Petri

Méthodes des quadrants

Ce mode d'ensemencement permet d'isoler les différentes bactéries contenues dans un mélange. Le dépôt de l'échantillon ou de la suspension de germe est effectué près d'un bord de la boîte de Petri, ou en une strie dans un quart de la boîte qui constituera le premier quadrant. Un isolement est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée ou d'un ensemenceur à usage unique stérile selon les différentes étapes de la figure 3.14.

Ainsi, par cette méthode, le dernier quadrant contient des colonies isolées dont la morphologie permet de s'orienter vers une espèce ou un genre bactérien voire une famille de bactérie. C'est à partir de ces colonies isolées que des tests d'identification pourront être pratiqués et la sensibilité aux antibiotiques testée. Parfois, une subculture peut être nécessaire pour parfaire l'obtention d'une culture pure avec un inoculum suffisant pour les tests à effectuer.

Ensemencement pour dénombrement des bactéries

Plusieurs approches en dehors de l'isolement en quadrants peuvent être retenues pour une appréciation semi-quantitative de la quantité de bactéries présentes.

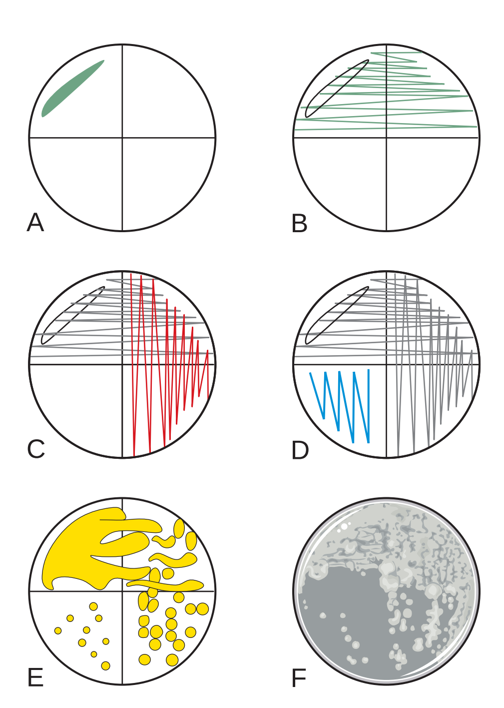


Fig. 3.14 Principe et résultat de la méthode d'isolement en quadrant. **A.** Dépôt de l'échantillon. **B.** Stries serrées sur la première moitié de la boîte (stries vertes). **C.** Après avoir tourné la boîte de 90°, des stries serrées sont à nouveau effectuées sur une moitié de boîte (stries rouges). **D.** Le dernier quadrant est ensemencé sans rentrer au contact des quadrants précédents. Cette technique permet d'obtenir dans le dernier quadrant des colonies isolées schématisées en **E** et en pratique en **F**.

Ensemencement en stries

Cette technique est en particulier appliquée pour estimer de manière approchée la quantité de bactéries dans les urines (Fig. 3.15). Un volume connu d'urine est déposé en strie d'un bord au centre de la boîte de Petri ; l'étalement est effectué en réalisant des stries serrées bord à bord comme indiqué sur la figure 3.15.

Ensemencement par la technique du râteau

À partir d'un volume défini déposé à la surface d'une gélose, 50, 100, ou 200 µl par exemple, il est possible d'étaler le

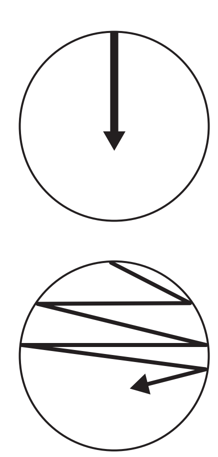


Fig. 3.15 Modalités d'ensemencement d'une gélose pour numération semi-quantitative. En haut, une strie est effectuée. L'étalement est effectué par des stries serrées sur l'ensemble de la boîte sans faire tourner celle-ci de 90°.

dépôt à l'aide d'un étaleur ou « râteau ». L'ensemble de la suspension est étalé sur la gélose en faisant tourner la boîte.

Ensemencement en spirale

Des appareils appelés « ensemenceurs en spirale » permettent d'étaler un volume donné à la surface d'une gélose en partant du centre jusqu'au bord.

Autres méthodes

Plusieurs souches peuvent être déposées sur une seule et même gélose en faisant des stries radiaires ou en faisant des stries parallèles.

Ensemencement pour étude de la sensibilité aux antibiotiques en milieu solide

Pour la méthode d'étude de la sensibilité aux antibiotiques par diffusion en gélose, il est recommandé d'inoculer les suspensions bactériennes, ajustées pour obtenir une densité bactérienne de 0,5 McFarland pour la très grande majorité des bactéries, à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension et « essoré » sur le bord du tube. Les géloses sont ensemencées par écouvillonnage de la totalité de la surface de la gélose dans trois directions ou en utilisant un ensemenceur rotatif.

Ensemencement des milieux solides en tube

La plupart de ces milieux sont ensemencés en surface sur la pente de la gélose soit en déposant quelques gouttes d'un liquide biologique, soit en faisant des stries à la surface de la pente à l'aide d'un ensemenceur à usage unique ou à l'aide d'un système automatisé.

Pour l'ensemencement de certains milieux particuliers comme le milieu de Kligler-Hajna, une piqûre centrale venant inoculer en profondeur la gélose complète l'ensemencement de la pente effectué par des stries à la surface.

Ensemencement des milieux liquides

Les milieux liquides d'enrichissement sont ensemencés directement avec le produit à analyser.

Les milieux liquides d'identification sont ensemencés en ajoutant des bactéries prélevées avec un ensemenceur ou bien en déposant quelques gouttes de la bactérie à étudier en suspension.

Tests biochimiques utilisés dans l'identification des bactéries

En fonction de l'aspect morphologique des colonies bactériennes, de la morphologie des bactéries après coloration, de leurs caractéristiques de croissance (vitesse, type respiratoire, exigences culturales, etc.), de leur pigmentation, de leur odeur, de leur caractère hémolytique sur gélose au sang, le bactériologiste s'oriente sur une famille bactérienne ou un genre bactérien en particulier. Il peut le cas échéant compléter sa présomption de genre bactérien par des tests d'orientation (type respiratoire, catalase et oxydase). Néanmoins, les identifications précises des espèces bactériennes font appel pour les bactéries d'intérêt médical les plus communes à des galeries d'identification biochimique manuelles ou pouvant être lues sur des systèmes automatisés – Vitek® (bioMérieux), Phoenix® (BD), Walk-Away® (Siemens) sont parmi les plus courants. Un certain nombre d'épreuves biochimiques de base sont utilisées dans l'élaboration des galeries d'identification des souches bactériennes.

Après avoir rappelé les tests d'orientation (type respiratoire, catalase et oxydase), un certain nombre d'épreuves métaboliques sont détaillées. Celles-ci concernent principalement le métabolisme glucidique, le métabolisme protéique et le métabolisme lipidique. Des tests d'agglutination viennent compléter l'identification bactérienne dans certains cas.

Principaux tests d'orientation

Étude du type respiratoire

L'ensemencement est effectué sur une gélose viande-foie (VF) préalablement régénérée au bain-marie bouillant pendant 20 minutes et lorsque la température est redescendue à 40 à 45 °C. Cet ensemencement est effectué soit à l'aide d'une pipette Pasteur de bas en haut en spirale, soit en déposant à la surface du tube maintenu à 45 °C la suspension de la bactérie à étudier puis à mélanger, le tube étant maintenu verticalement, en faisant des 8 de chiffre. Les tubes sont ensuite refroidis sous l'eau du robinet. Après 24 heures à 37 °C, la lecture consiste à étudier le niveau du tube où une croissance bactérienne est visible (Fig. 3.16).

Une façon quotidienne d'apprécier le type respiratoire bactérien est de comparer les cultures bactériennes incubées en aérobiose et en anaérobiose pour savoir si la bactérie est anaérobie stricte, aérobie stricte ou aéro-anaérobie facultative. Dans ce cas, le caractère microaérophile n'est pas appréciable.

Recherche de la catalase

Certaines bactéries ont la faculté de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En présence d'une bactérie productrice de catalase, on observe à partir d'H_2O_2 une libération d'oxygène gazeux selon la réaction : H_2O_2 donne $H_2O + 1/2\ O_2$ (Fig. 3.17).

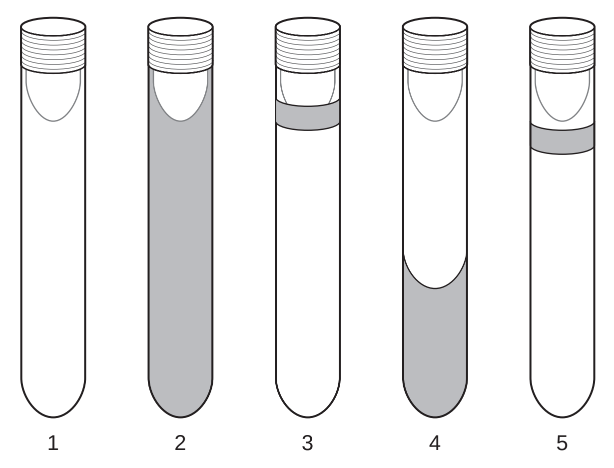


Fig. 3.16 Étude du type respiratoire bactérien sur gélose viande-foie. Tube 1 : tube non ensemencé. Tube 2 : croissance sur toute la hauteur du tube, type respiratoire aéro-anaérobie (par exemple *Escherichia coli*). Tube 3 : croissance dans la zone supérieure du tube, type respiratoire aérobie strict (par exemple *Pseudomonas aeruginosa*). Tube 4 : croissance dans la zone profonde du tube, type respiratoire anaérobie strict (par exemple *Clostridium* spp.). Tube 5 : croissance dans la zone intermédiaire aéro-anaérobie du tube, type respiratoire micro-aérophile (par exemple *Campylobacter* spp.).

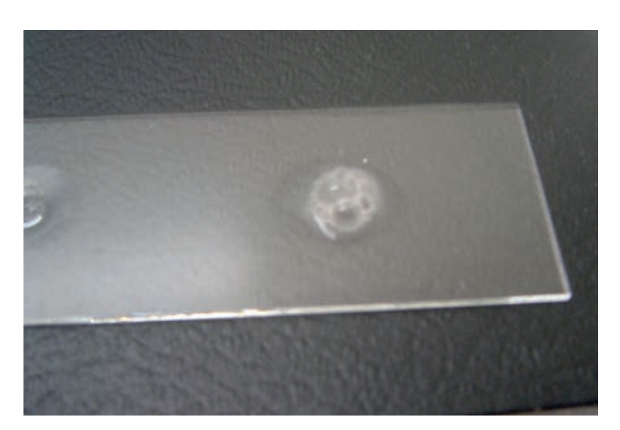


Fig. 3.17 Réaction de catalase positive (par exemple *S. aureus*).

Recherche d'une cytochrome oxydase

Les bactéries possédant une chaîne respiratoire complète sont dotées d'une cytochrome oxydase. La mise en évidence de cette oxydase est effectuée en présence d'une solution aqueuse à 1 % de chlorhydrate de diméthylparaphénylène diamine qui forme un complexe violet au contact de cette enzyme (Fig. 3.18). Les colonies sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur.

Étude des accepteurs minéraux, recherche d'une nitrate réductase

Les bactéries, lorsqu'elles possèdent une nitrate réductase, sont capables de transformer les nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-) et éventuellement en azote (N_2) (Fig. 3.19).

Un bouillon nitraté (bouillon nutritif supplémenté de 1,5 % de nitrates de potassium) est ensemencé avec la bactérie à étudier et incubé 18 heures à 37 °C (Fig. 3.19A). Après incubation, 3 gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (Griess A) et 3 gouttes d'une solution de naphtylamine (Griess B) sont ajoutées au bouillon. Si une coloration rose fugace apparaît (Fig. 3.19B), les nitrates ont été réduits au stade nitrites. En l'absence de coloration, soit les nitrates ont été réduits au stade azote, soit la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. L'addition de poudre de Zinc (réactif de Zobell, qui va réduire les nitrates en nitrites) permet de trancher. Si une coloration rose apparaît, alors la bactérie ne possède pas de nitrate réductase (Fig. 3.19C). Si aucune modification de coloration n'est visible après ajout de zinc, alors les nitrates avaient été réduits au stade azote (Fig. 3.19D).



Fig. 3.18 À gauche, réaction d'oxydase positive (par exemple *P. aeruginosa*). À droite réaction négative (par exemple *E. coli*).

Étude du métabolisme glucidique

Étude de la voie d'attaque des glucides MEVAG (milieu de Hugh et Leifson)

Les bactéries peuvent utiliser les glucides selon deux voies. La voie fermentative se déroule en l'absence d'oxygène de l'air et les catabolites formés, acides, entraînent une diminution du pH du milieu. Par voie oxydative, l'oxygène de l'air est utilisé et peu de catabolites acides sont formés.

Deux milieux semi-solides contenant un indicateur de pH (par exemple du bleu de bromothymol) sont régénérés au bain-marie bouillant 20 minutes. Ensuite, lorsqu'ils sont refroidis autour de 45 °C, 6 gouttes d'une solution de glucose à 30 % (concentration finale en glucose de 1 %) sont ajoutées. Les milieux sont ensuite refroidis complètement et ensemencés par piqûre centrale. L'un des deux tubes est recouvert de 0,5 cm d'huile de paraffine stérile. Ce tube constitue le tube dit « fermé », c'est-à-dire dans lequel les réactions s'effectueront en l'absence d'oxygène. L'autre tube est dit « ouvert ». Les résultats des deux voies d'attaque des glucides sont présentés à la figure 3.20.

Milieu mannitol-mobilité

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant entre autres du mannitol et du rouge de phénol comme indicateur de pH. Après régénération au bain-marie bouillant pendant 20 minutes, le milieu est refroidi totalement puis ensemencé par piqûre centrale. Lorsque l'indicateur coloré passe du rouge au jaune, ce qui correspond à l'acidification du milieu,

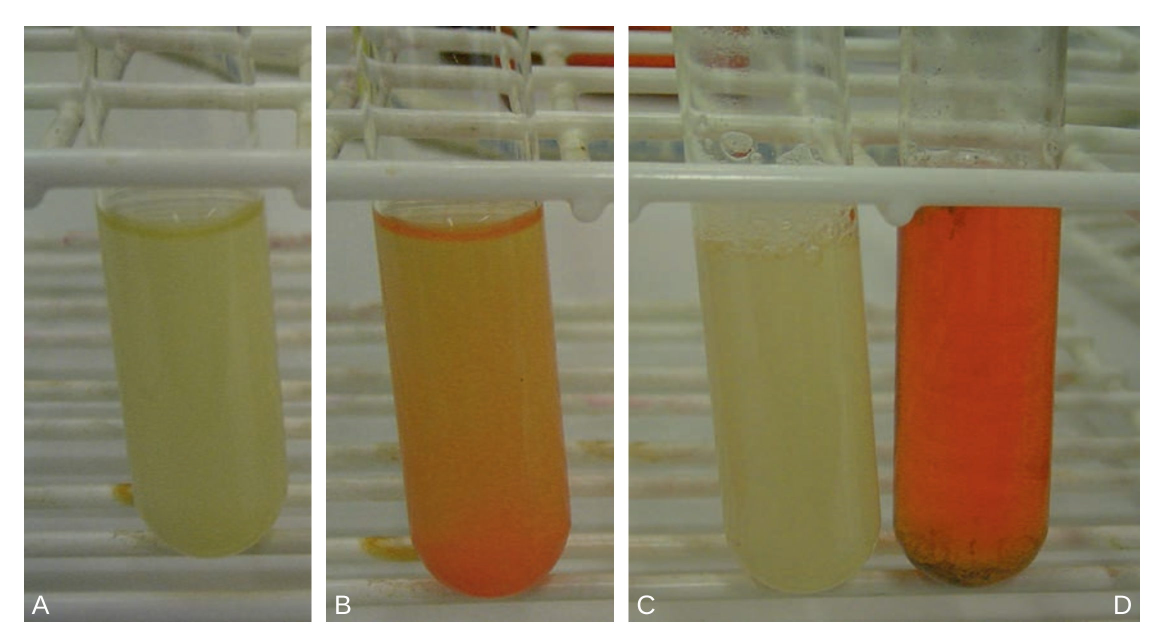


Fig. 3.19 Recherche d'une nitrate réductase. A. Bouillon nitraté après culture avant ajout des réactifs. **B.** Après ajout des réactifs Griess A et Griess B, apparition d'une coloration rose (stade nitrites) : présence de nitrate réductase (par exemple *Escherichia coli*). **C.** Après ajout de poudre de zinc, absence de coloration (stade azote) : présence d'une nitrate réductase (par exemple *Pseudomonas aeruginosa*). **D.** Après ajout de poudre de zinc, apparition d'une coloration rose : absence de nitrate réductase (par exemple *Acinetobacter baumannii*).

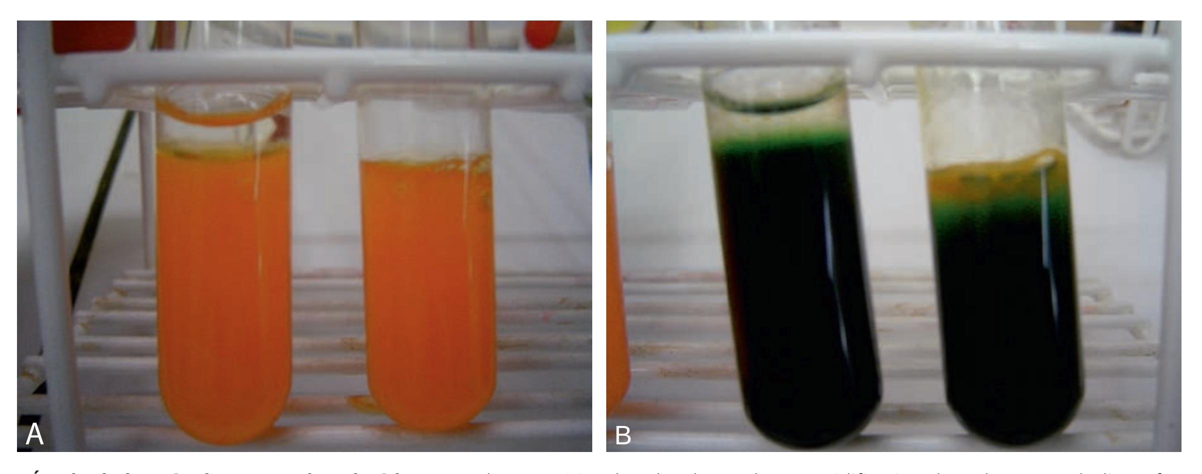


Fig. 3.20 Étude de la voie d'attaque des glucides. A. Culture positive dans les deux tubes et acidification des tubes : métabolisme fermentatif (par exemple entérobactéries). **B.** Culture positive et acidification uniquement dans la partie supérieure du tube « ouvert » : métabolisme oxydatif (par exemple *Pseudomonas aeruginosa*).

le mannitol a été utilisé. Le caractère mobile est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose de part et d'autres de la piqûre centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqûre centrale.

Étude de la fermentation de plusieurs sucres pour l'identification des entérobactéries

Le milieu de Kligler-Hajna ou milieu lactose-glucose-H_2S est le plus couramment utilisé. Ce milieu solide en pente contient du glucose (0,1 %), du lactose (1 %), des acides aminés, de thiosulfate de sodium, du citrate ferrique et du rouge de phénol. Ce milieu est ensemencé avec la souche à étudier en effectuant des stries à la surface de la pente de la gélose, puis le culot est ensemencé par piqûre centrale.

Les bactéries acidifient le glucose en anaérobiose relative (culot) ; le culot vire au jaune (par exemple entérobactéries). Si le germe n'utilise pas le lactose, la pente devient rouge par réalcalinisation du milieu due à la formation de produits alcalins provenant de la dégradation des acides aminés (par exemple *Proteus*) (Fig. 3.21). Si les bactéries utilisent le lactose en aérobiose relative (pente), il y a virage de la pente au jaune (par exemple *E. coli*). Le milieu peut être coloré en noir de façon plus ou moins intense par production d'H_2S. Une pointe fine d'H_2S est observée pour *Salmonella* Typhi. Le milieu peut être entièrement noir. La présence de gaz est détectée par la mise en évidence de bulles ou le soulèvement de la gélose. Un milieu contenant en plus du saccharose à 1 % peut être utilisé ; il s'agit du milieu TSI (*Triple-Sugar-Iron*).

Étude de la dégradation du lactose

Il s'agit de la recherche d'une bêta-galactosidase qui dégrade le lactose en galactose et glucose. En pratique, ce test utilise l'ortho-nitrophényl-galacto-pyranoside (ONPG) ou le para-nitrophényl-galacto-pyranoside (PNPG). L'ONPG et le PNPG qui diffusent spontanément dans la bactérie (à la différence du lactose qui nécessite une perméase) sont dégradés par la bêta-galactosidase en galactose et orthonitrophénol ou paranitrophénol respectivement, qui sont des composés jaunes. Ces tests sont inclus dans la plupart des galeries d'identification. Individuellement, ils peuvent être réalisés en mettant en contact une suspension bactérienne épaisse en eau physiologique avec un disque d'ONPG par exemple. Après mise à l'étuve à 37 °C pendant 18 heures, l'apparition d'une coloration jaune peut être observée. Les entérobactéries ONPG négative sont par exemple *Salmonella*, *Shigella* et *Proteus*. *Enterobacter* et *Escherichia coli* par exemple possèdent une bêta-galactosidase.

Recherche de métabolites formés à partir de l'acide pyruvique

À partir du milieu de Clark-Lubs contenant de l'acide pyruvique, la formation d'acide formique et d'acide acétique (réaction de rouge de méthyle [RM]) et la formation d'acétoïne ou acétyl-méthylcarbinol (réaction de Voges-Proskauer [VP]) sont étudiées (Fig. 3.22).

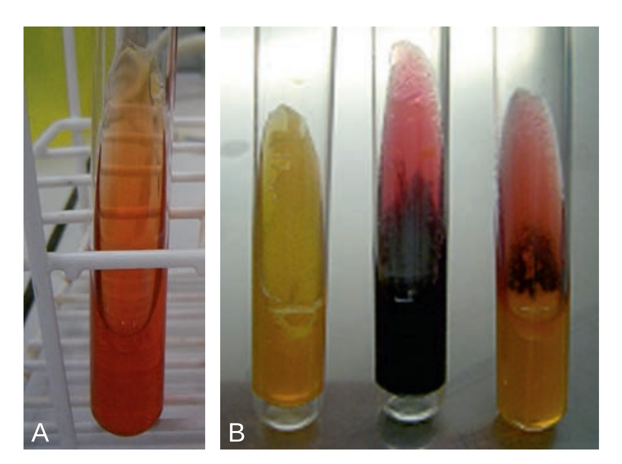


Fig. 3.21 Interprétation des résultats du milieu Kligler-Hajna. **A.** Milieu de Kligler-Hajna non ensemencé. **B.** De gauche à droite, bactérie glucose +, lactose +, productrice de gaz (*E. coli*); bactérie glucose +, lactose –, H2S +, productrice de gaz; bactérie glucose +, lactose –, H2S + faiblement (*Salmonella* Typhi).

En pratique, la réaction de VP est fréquemment réalisée notamment sur les galeries miniaturisées. Sinon, le bouillon Clark-Lubs est ensemencé et incubé 18 heures à 37 °C. À 1 ml de culture, ajouter 0,5 ml d'alpha naphtol à 6 % et 0,5 ml de soude à 16 %. La lecture est à effectuer dans les 10 minutes. Les entérobactéries des genres *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia* produisent de l'acétoïne, test VP +.

Dégradation de l'esculine

L'esculine est un sucre. Certaines bactéries comme les entérocoques peuvent hydrolyser l'esculine en esculétine et glucose. L'esculétine se lie au citrate ferrique présent dans le milieu pour former un complexe brun-noir correspondant à une réaction positive (Fig. 3.23).

Étude du métabolisme protéique

L'appréciation du pouvoir protéolytique n'est que peu utilisée actuellement. Plusieurs méthodes permettent d'apprécier la protéolyse de la gélatine; elles sont citées ici pour mémoire : la méthode de Frazier, la méthode de Kohn et la méthode de Le Minor et Piechaud. L'étude de la protéolyse de gélatine associée à de l'encre de Chine permet, lorsque le pigment noir diffuse, d'apprécier cette activité. Ce test est inclus dans les galeries miniaturisées.

Actuellement, les tests les plus utilisés concernent la mise en évidence d'enzymes intervenant dans la dégradation des acides aminés.



Fig. 3.23 Résultats du milieu à l'esculine. À gauche, tube ensemencé avec une bactérie esculine négative. À droite, tube ensemencé avec une souche esculine positive (*Enterococcus faecalis*).

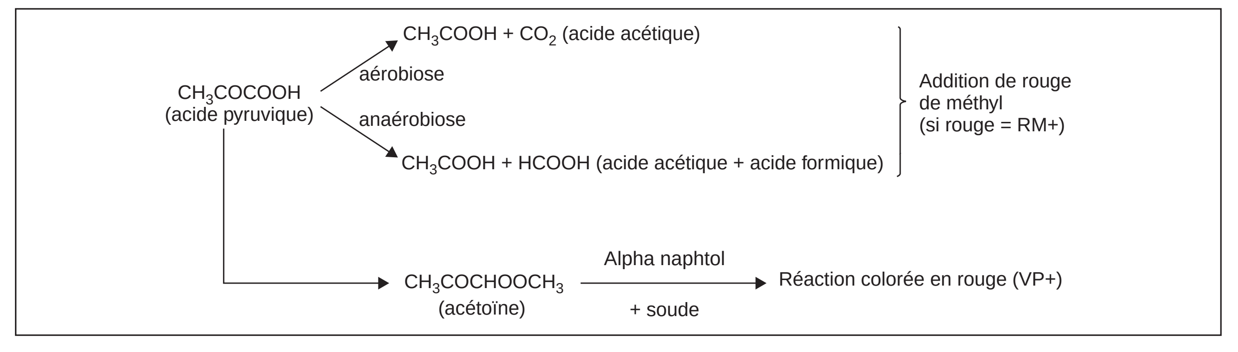


Fig. 3.22 Mise en évidence des métabolites formés lors de la dégradation de l'acide pyruvique.

Recherche de décarboxylases

Trois décarboxylases sont fréquemment recherchées : la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH). Les tests correspondants sont présents notamment sur les galeries API 20 E®. Le test individuel peut être effectué sur le milieu de Taylor contenant l'acide aminé étudié (soit la lysine, soit l'ornithine, soit l'arginine), du glucose et un indicateur coloré, le bromocrésol pourpre. La réaction s'effectue en deux temps. Lorsque le glucose est fermenté, il y a virage au jaune du bromocrésol pourpre ; lorsque l'acide aminé est décarboxylé, il y a une réalcalinisation du milieu qui vire au violet. Après 18 heures à 37 °C, un milieu violet trouble correspond à une réaction positive. Par exemple, *E. coli* possède une lysine décarboxylase alors que *Proteus vulgaris* n'en possède pas (Fig. 3.24).

Recherche de désaminases

Recherche de tryptophane désaminase

À partir du milieu de Ferguson contenant du tryptophane, du rouge de phénol et de l'urée, il est possible de mettre en évidence une activité tryptophane désaminase (TDA). Une suspension bactérienne dense dans un milieu de Ferguson permet, après incubation à 37 °C pendant 18 heures et ajout d'une goutte de perchlorure de fer à 30 %, de mettre en évidence une coloration brune si la bactérie testée est dite TDA + (Fig. 3.25).

Les entérobactéries TDA + appartiennent aux genres *Proteus*, *Providencia* et *Morganella*.

Recherche d'une phénylalanine désaminase

De la même façon, une gélose à la phénylalanine peut être ensemencée pour mettre en évidence une phénylalanine désaminase. Après incubation de 18 heures à 37 °C et ajout de quelques gouttes de perchlorure de fer à 30 %, il apparaît en cas de positivité une coloration verte.

Recherche de tryptophanase

La production d'indole par hydrolyse du tryptophane peut être effectuée à partir d'une culture de 24 heures de la souche à étudier en milieu de Ferguson ou en eau peptonée dépourvue d'indole. L'indole produit donne une coloration rouge en présence du réactif de Kovacs (para-diméthylaminobenzaldéhyde + alcool isoamylique) ou du réactif de James (Fig. 3.26).

La formation d'un anneau rouge correspond à une réaction positive ; c'est le cas avec *E. coli*. *Proteus mirabilis*, par exemple, n'hydrolyse pas le tryptophane en indole.

Recherche de désulfhydrases

Cette recherche est réalisée sur milieu de Kligler-Hajna ou fait partie des tests des galeries. La dégradation des acides aminés soufrés conduit à la formation de groupements SH





Fig. 3.24 Exemple de mise en évidence d'une lysine décarboxylase chez *E. coli*. À gauche, le test effectué sur le milieu de Taylor, à droite le test effectué sur galerie API 20 E® (test LDC).

(Tryptophane) – CH – COOH / NH_2 —TDA→ (acide indol-pyruvique) CO – COOH + NH_3 —$FeCl_3$→ coloration brune

Fig. 3.25 Mise en évidence de la dégradation du tryptophane par une tryptophane désaminase.

$$\text{(Tryptophane)} + H_2O \longrightarrow \text{(Indole)} + CH3-CO-COOH + NH_2 \text{ (acide pyruvique)}$$

Fig. 3.26 Mise en évidence de la production d'indole.

ou H_2S qui se combinent avec le citrate de fer ammoniacal du milieu pour former du sulfure de fer noir. *Salmonella* Typhimurium par exemple est H_2S positif, alors qu'*E. coli* est H_2S négatif.

Étude du métabolisme lipidique

La recherche d'une lipase sur milieu au Tween 80® est détectée par une opacification du milieu, ce qui est le cas pour *S. aureus*. Le milieu de Baird-Parker contenant de la lécithine, du jaune d'œuf permet de mettre en évidence une lécithinase par apparition d'un halo clair autour des colonies (par exemple *S. aureus*).

Autres tests

Recherche d'une uréase

La recherche d'une uréase s'effectue en milieu urée-tryptophane (improprement appelé milieu urée-indole). Ce milieu contient du tryptophane, de l'urée et du rouge de phénol comme indicateur de pH. L'urée, sous l'action d'une uréase bactérienne va être transformée en carbonate d'ammonium alcalin entraînant une coloration rose-rouge du milieu (Fig. 3.27). Ce milieu ne permet pas la croissance bactérienne. Il permet également la recherche d'une tryptophane désaminase selon la méthode précédemment décrite.

Recherche d'autres enzymes

Recherche d'une DNAse

La mise en évidence de la production d'une DNAse est effectuée sur une gélose contenant de l'ADN. Les bactéries sont ensemencées en réalisant une strie à la surface de la gélose ; la gélose est incubée 18 heures à 37 °C. L'hydrolyse de l'ADN est révélée en ajoutant de l'acide chlorhydrique. Lorsque l'ADN a été dégradé, un halo clair est visible au pourtour de la strie, alors que l'ADN, sous l'action de l'acide, est à l'origine d'un précipité blanchâtre (Fig. 3.28).

Recherche d'une coagulase

La coagulation du plasma de lapin oxalaté par une coagulase s'effectue à partir d'un bouillon enrichi comme le bouillon staphylocoagulase. Un bouillon de 18 heures incubé à 37 °C est mis en contact volume à volume avec du plasma de lapin oxalaté pendant au moins 30 minutes à 37 °C. Si la bactérie possède une coagulase, il y a coagulation du plasma de lapin.

Utilisation du citrate comme unique source de carbone

Le milieu au citrate de Simmons contient du citrate de sodium et du sel d'ammonium ainsi que du bleu de bro-



Fig. 3.27 Mise en évidence de la production d'uréase. Exemple de réaction positive pour *Proteus mirabilis* à gauche et négative à droite (*E. coli*).

mothymol. Une utilisation du citrate se traduit par une culture sur la gélose et, le plus souvent, cette croissance s'accompagne d'une libération d'ammoniaque à partir des sels d'ammonium, ce qui se traduit par un virage du bleu de bromothymol au bleu. Par exemple, *Klebsiella pneumoniae* entraîne une croissance et une coloration bleue du milieu, ce qui n'est pas le cas d'*E. coli*.

Tests antigéniques utilisés dans l'identification bactérienne

Tests d'agglutination à partir des colonies bactériennes

Un nombre important de réactions d'agglutination participent à l'identification bactérienne. Le plus souvent, ces tests sont fondés sur l'utilisation d'hématies ou de particules de latex sensibilisées avec des anticorps spécifiques du pathogène recherchés. Pour *S. aureus*, plusieurs tests d'agglutination détectant un ou plusieurs antigènes ou récepteurs de surface (récepteur pour le fibrinogène, protéine A, antigènes capsulaires) sont commercialisés. En pratique, il est recommandé d'utiliser deux tests pour l'identification de *S. aureus* : la détection de la coagulase et un test d'agglutination. L'identification des streptocoques bêta-hémolytiques par agglutination de la structure du polyoside C pariétal participe également à l'identification de ces bactéries.

L'identification des sérotypes bactériens fait appel aux méthodes d'agglutination, qui sont fondées sur l'utilisation d'immunsérums polyvalents et monovalents reconnaissant des antigènes bactériens. Dans le cas des salmonelles, les sérotypes sont identifiés sur la base des propriétés antigéniques des antigènes O de paroi et antigènes H flagellaires, et éventuellement la recherche de l'antigène Vi. Pour les *E. coli*, des agglutinations

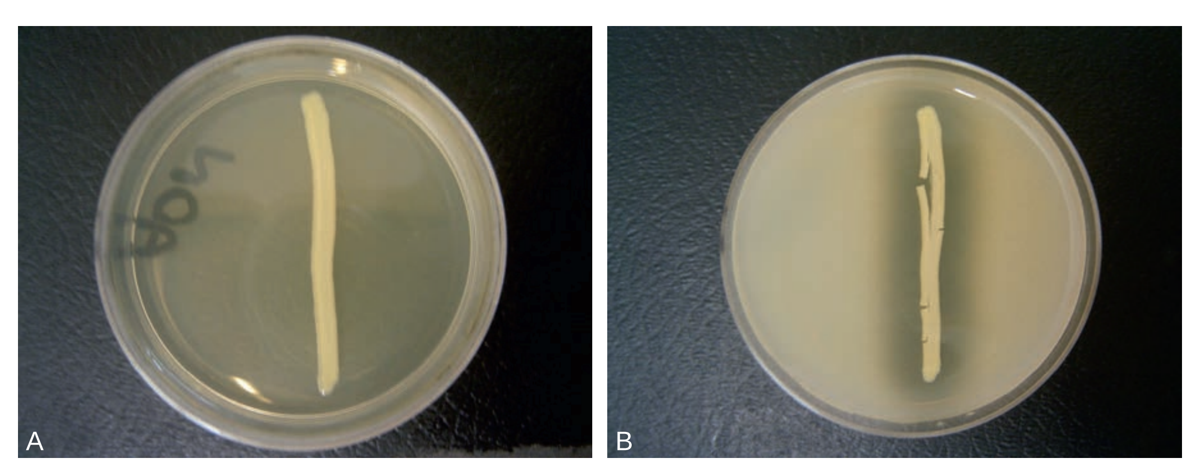


Fig. 3.28 Recherche de la production d'une DNAse. *Staphylococcus epidermidis* à gauche (DNAse négative). *S. aureus* à droite (DNAse positive).

permettent d'identifier certains sérotypes pathogènes dans les selles (O157:H7 ; O111, etc.), mais également capsulaires (*E. coli* K1). Une réaction d'agglutination confirme l'identification des espèces de *Shigella*. Divers sérotypes de *P. aeruginosa* peuvent être identifiés sur la base de leurs antigènes O.

Recherche d'antigènes bactériens dans les milieux biologiques

La présence d'une bactérie peut être détectée par la mise en évidence d'antigènes bactériens de paroi ou de substances sécrétées comme des toxines. Ces antigènes peuvent être détectés au niveau du site infecté ou à distance, comme dans les urines. Ainsi, la mise en évidence d'antigènes de *Legionella pneumophila* sérogroupe 1 dans les urines par technique immunochromatographique participe grandement au diagnostic des infections pulmonaires dues aux légionelles de ce sérogroupe. La recherche d'antigènes de pneumocoque dans les urines, par le même type de technique, pour les infections pulmonaires ou dans les produits pathologiques comme le liquide céphalorachidien dans les méningites à pneumocoque peut contribuer au diagnostic. Les recherches d'antigènes solubles par réaction d'agglutination tendent à être abandonnées au profit des techniques immunochromatographiques ou au profit des techniques moléculaires plus sensibles et plus spécifiques.

Une revue détaillée sur le diagnostic rapide par recherche d'antigènes (F. Denis et M.-C. Ploy) peut être trouvée dans la 2e édition du présent ouvrage, p. 35–42.

Galeries miniaturisées et automates d'identification bactérienne

Les tests effectués en tube de 15 ou 20 ml ont été progressivement remplacés depuis de nombreuses années par des tests miniaturisés en galerie dans lesquels les différents substrats étaient déshydratés. Pour n'en citer qu'un seul type, universellement employé, il s'agit du système API® de bioMérieux. Ces tests d'identification sont fondés sur l'étude d'une dizaine, d'une vingtaine ou de 32 caractères en fonction des genres et espèces bactériens à identifier. Ces tests sont fondés soit sur une croissance bactérienne associée à une étude de métabolisme (incubation de 18 à 24 heures éventuellement prolongée à 48 heures), soit sur une recherche d'activité enzymatique ne nécessitant pas de multiplication bactérienne, l'inoculum de départ étant plus important dans ce cas. Afin de faciliter l'interprétation de ces tests colorimétriques ou turbidimétriques, des appareils de lecture peuvent être utilisés permettant de faire bénéficier à l'utilisateur de logiciels d'interprétation de l'identification.

Actuellement, les tests biochimiques d'identification sont effectués plus souvent sur des automates. Ces automates permettent également la réalisation des antibiogrammes en milieu liquide pour la plupart des germes courants. Les tests utilisés correspondent à la plupart de ceux précédemment décrits avec l'utilisation, en fonction des utilisateurs et des versions d'automates de substrats conventionnels, de substrats chromogéniques, fluorescents ou fluorogéniques, de carbohydrates couplés à une lecture colorimétrique, turbidimétrique ou fluorimétrique, etc. Les méthodologies utilisées dépendent des fabricants.

Les systèmes Vitek® technology (bioMérieux) (Fig. 3.29A) utilisent des cartes plastiques renfermant des microcupules, chaque cupule contenant un substrat spécifique déshydraté. Une quarantaine de substrats sont testés. Les cartes sont identifiées par un code à barres précisant le type de carte (carte Gram positif, carte Gram négatif, carte anaérobies/corynébactéries, *Neisseria*/*Haemophilus*), le numéro de lot, la date de péremption. L'inoculum de départ doit être voisin de 0,5 McFarland et le délai d'obtention du résultat variable de 2 à 8 heures pour les Gram positif et de 2 à 10 heures pour les Gram négatif. La lecture est colorimétrique. Les tests varient bien évidemment en fonction des cartes et, sur ce principe, plus de 120 espèces peuvent être identifiées pour les Gram positif et plus de 150 pour les Gram négatif fermentants et non fermentants. Un algorithme d'interprétation est ensuite utilisé par l'appareil pour associer à un taxon particulier des résultats de métabolisme biochimique.

L'automate Phoenix® de la firme BD utilise une démarche assez voisine avec des caractéristiques assez comparables (Fig. 3.29B).

Les appareils Walk-away® de Siemens permettent d'identifier de manière globalement un nombre similaire de taxons (Fig. 3.29C).



Fig. 3.29 **Automates d'identification bactérienne.** A. Vitek® II (bioMérieux). B. Phoenix® (BD). C. Microscan WalkAway® 96 Plus (Siemens).

En fonction des fabricants, ces automates permettent, de façon indépendante de l'identification ou conjointe, de tester la sensibilité des bactéries identifiées aux antibiotiques.

Autres méthodes d'identification bactérienne

Méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires, en particulier fondées sur les réactions de polymérisation en chaîne (PCR), sont utilisées depuis quelques années par les laboratoires et permettent en particulier de diagnostiquer des infections dues à des bactéries non ou difficilement cultivables sur milieux classiques ou de croissance lente. Elles permettent également de mettre en évidence le portage de certaines bactéries et peuvent s'appliquer directement sur le produit pathologique ou bien à partir des cultures.

Ces méthodes sont utilisées pour détecter un pathogène en particulier. L'approche peut être spécifique de genre ou d'espèce bactérienne en fonction de la spécificité des amorces ou, au contraire, pour détecter la présence de bactéries. Cette dernière approche dite par « PCR universelle » permet d'amplifier une cible retrouvée chez toutes les espèces bactériennes. L'identification de l'espèce en cause sera alors fondée sur le séquençage du fragment amplifié, puis la comparaison de la séquence obtenue avec les banques de données.

Au départ, ces méthodes étaient réservées aux laboratoires très spécialisés et aux centres de référence ; elles sont actuellement plus largement utilisées. Initialement, la méthodologie était fondée sur une PCR en point final avec détection des produits d'amplification par migration en gel d'agarose notamment. Maintenant, de plus en plus ces méthodes font appel à des techniques de PCR en temps réel, c'est-à-dire que la détection du matériel amplifié est effectuée au fur et à mesure des cycles d'amplification en se fondant sur l'utilisation de molécules fluorescentes, en s'appuyant sur des sondes spécifiques marquées ou en utilisant un agent intercalant fluorescent comme le SybrGreen®.

Les techniques initialement développées au sein des laboratoires sous forme de PCR dites « maison » sont de plus en plus souvent commercialisées sous forme de coffret pour répondre à des exigences de qualité et de traçabilité des réactifs employés. Les contraintes organisationnelles, faisant appel à des salles différentes en fonction des différentes étapes (extraction d'acides nucléiques bactériens, préparation du mélange réactionnel, amplification couplée à la détection, ou salle supplémentaire si nécessité de réaliser une étape post-PCR), restent recommandées pour éviter de possibles contaminations. Des appareils combinant extraction, amplification et détection existent et sont maintenant disponibles, permettant d'effectuer en urgence, et sans forcément un environnement microbiologique spécialisé, des tests très performants. Certains de ces tests ont été développés pour être appliqués sur le terrain en permettant notamment le diagnostic de la tuberculose en pays de forte incidence.

La présence de certains gènes de résistance peut également être recherchée par ces méthodes ; c'est le cas notamment pour le bacille tuberculeux, avec la recherche de la résistance à la rifampicine notamment, qui est un marqueur de souche multirésistante, et la recherche du gène *mec*A chez les staphylocoques responsables de la résistance aux pénicillines du groupe M.

De plus en plus, les PCR diagnostiques associent la détection de plusieurs pathogènes sous forme de PCR multiplex. Les coffrets commercialisés actuellement sont très souvent multiparamétriques et permettent la recherche de plusieurs bactéries/virus, ou le cas échéant des parasites, favorisant de plus en plus une approche diagnostique par syndrome. Ainsi, il existe des coffrets « méningites », « sepsis », « infections pulmonaires », etc.

Des techniques couplant la PCR et la détection des amplicons par spectrométrie de masse sont en train de voir le jour.

Les principes généraux seront détaillés dans le chapitre dédié à la biologie moléculaire et ses applications et repris dans les chapitres concernés.

Spectrométrie de masse

Récemment sont apparus sur le marché des spectromètres de masse fondés sur la technologie MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight*) utilisant des bactéries entières et permettant l'identification bactérienne au rang d'espèce par comparaison des pics protéiques obtenus avec les banques de données. Ces solutions d'identification présentent l'intérêt majeur d'être très rapides (quelques minutes) et de pouvoir tester très facilement plusieurs colonies d'une même boîte.

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF repose sur l'analyse de l'ensemble des protéines de chacune des bactéries. Le principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF est décrit à la figure 3.30.

Trois étapes distinctes se succèdent dans l'analyse par spectrométrie de masse :

- ionisation/désorption : les colonies bactériennes ou le matériel à analyser sont déposés sur un support et sont inclus dans une matrice (l'alpha-cyano 4-hydroxy cinnamique ou l'acide sinapinique par exemple). Le complexe ainsi formé est bombardé par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice. Les ions gazeux alors générés sont accélérés sous haut voltage dans un champ électrique qui les dirige vers l'analyseur;

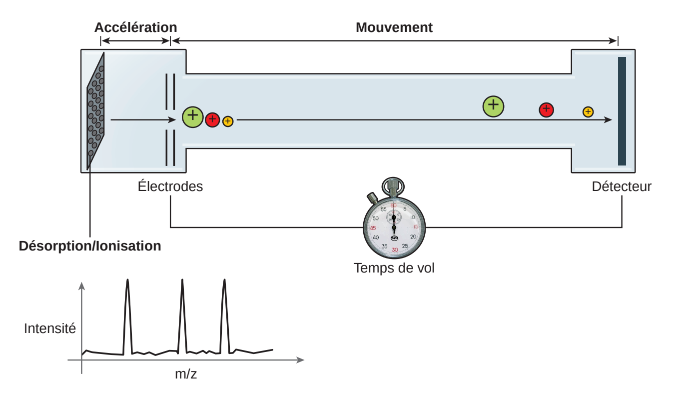


Fig. 3.30 Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

- l'analyseur permet de séparer et de classer les ions libres selon leur temps de vol, *time of flight* (TOF) qui dépend du rapport masse/charge (m/z). Les ions présentant le rapport m/z le plus petit sont les premiers à arriver;
- le détecteur transforme le courant ionique en courant électrique. Le courant généré est alors amplifié, numérisé et enregistré sous forme de spectres de masse (rapport m/z en fonction de l'intensité).

Afin de minimiser les interférences pouvant provenir de la collision de particules entre elles, toutes ces opérations sont réalisées dans une enceinte soumise à un vide poussé.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet l'identification de bactéries par l'étude de leurs protéines totales. Le dépôt peut être réalisé sous deux formes; soit on part directement de la culture bactérienne, soit on effectue au préalable une extraction des protéines. Quelle que soit la méthodologie choisie, le dépôt est réalisé sous forme d'une couche mince sur un support, puis recouvert de la matrice donneuse d'électron; le tout sera ensuite bombardé par un faisceau laser. Les spectres sont lus pour des masses comprises entre 2000 et 20 000 Dalton (Da).

Une banque de spectres est construite par plusieurs mesures d'une espèce bactérienne ou d'une souche connue sous différentes conditions de cultures. Un profil moyen est alors obtenu après mesure d'environ 20 spectres. Le logiciel génère automatiquement la liste des pics obtenus de tous les spectres et extrait les pics typiques présents dans un certain nombre de spectres d'une seule espèce. Selon les différentes études publiées jusqu'à maintenant, 95 à 97,5 % des bactéries isolées dans les laboratoires de microbiologie sont identifiées correctement à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ces résultats sont comparables (voire meilleurs) à ceux obtenus avec des automates utilisant des méthodes conventionnelles.

L'identification d'un spectre inconnu est réalisée à l'aide d'un algorithme de reconnaissance qui considère la position des pics dont l'intensité est comprise dans une échelle de 1 à 1000. Une fois le spectre obtenu, il est comparé aux spectres de la banque de données en tenant compte de la masse et de l'intensité des pics. Un algorithme statistique permettra alors de donner l'identification du micro-organisme. Les algorithmes, les bases de données et la présentation des résultats diffèrent selon les constructeurs. Trois automates sont actuellement commercialisés en France : le Vitek® MS (bioMérieux), le Microflex® (Bruker) et le LT2-Andromas® (Fig. 3.31).



Fig. 3.31 Spectromètres de masse MALDI-TOF commercialisés en France. A. Vitek® MS (bioMérieux). B. Microflex® (Bruker). C. LT2 Andromas®.

De plus, des études ont aussi montré une bonne corrélation d'identification directement à partir d'un flacon d'hémoculture positif ou d'une urine dont l'inoculum est d'au moins 10^5 UFC/ml.

Cette technique peut aussi être utilisée en mycologie avec notamment l'identification possible des levures et des *Aspergillus*.

Il est à noter que différentes études font état de la possibilité de faire du typage de souche par spectrométrie de masse MALDI-TOF ainsi qu'un génotypage de polymorphisme ponctuel ou SNP (*single nucleotide polymorphisms*). Enfin, certains laboratoires utilisent cette technique pour la recherche de gènes de résistance tels que les carbapénémases.

Pour en savoir plus

Carbonnelle, B, Denis, F, Marmonier, A, et al. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Simep ; 1987.

Denis, F, Ploy, MC, Martin, C, et al.Bactériologie médicale. Techniques usuelles. In : 2e éd Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson : 2011.

Les enseignant du laboratoire de microbiologie-immunologie de la Faculté de Pharmacie de Tours, Polycopié de Travaux Pratiques de 2e année. Université François Rabelais, Tours.

Marchal et coll., 1982 Marchal, N, Bourdon, JL, Richard, C. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Paris : Doins Éditeurs : 1982.

Milieux et réactifs de Laboratoire Pasteur. Microbiologie immunologie. Diagnostics Pasteur. Oxoid Le Manuel Editions ; . 2001.

3.2 Typage moléculaire des souches

C. Isnard, F. Guérin, V. Cattoir

Introduction

Les objectifs du typage moléculaire de souches isolées d'une espèce bactérienne sont multiples : déterminer l'existence et l'extension d'une épidémie, identifier les réservoirs, les sources et les modes de transmission d'un agent infectieux, évaluer l'efficacité de mesures préventives, vérifier l'efficacité d'un traitement (différencier une rechute d'une récidive), suivre la prévalence de types particuliers d'une espèce bactérienne parmi une population colonisée ou infectée afin de planifier des mesures préventives.

En épidémiologie, il est indispensable de déterminer la notion qui définit un ensemble de souches bactériennes isolées indépendamment les unes des autres, mais qui montrent des caractères phénotypiques et génotypiques tellement proches que la seule explication valable pour de telles ressemblances est celle d'une origine commune.

Traditionnellement, le typage était fondé sur le phénotype tel que le sérotype, le biotype, le phage type ou l'antibiogramme. Contrairement aux techniques phénotypiques, les marqueurs moléculaires présentent pour la très grande majorité des techniques une capacité de typage importante et un pouvoir discriminant élevé. L'analyse de l'ADN extra-chromosomique (profil plasmidique) ou de l'ADN chromosomique sont les deux approches techniques pouvant être mises en œuvre en fonction du contexte de surveillance épidémiologique locale ou globale.

Il est possible de classer les méthodes de typage en quatre catégories :

- les techniques de séquençage de fragments d'ADN ;
- les techniques de restriction enzymatique ;
- les techniques d'amplification génique fondées sur la PCR ;
- les techniques fondées sur le séquençage complet ou *whole genome sequencing* (WGS).

En fonction des techniques, l'analyse sera réalisée sur le génome dans sa globalité, ou pour être plus précis, elle inspectera différents sites dispersés sur l'ensemble du chromosome (techniques de restriction enzymatique). D'autres, au contraire, cibleront seulement quelques gènes, ne donnant ainsi qu'une vision partielle ou focale du génome bactérien.

Dans tous les cas, à l'exception du WGS, si la méthode utilisée ne montre aucune différence entre les souches analysées, il faudra toujours garder à l'esprit que des différences situées ailleurs sur le génome, donc non étudiées, peuvent tout de même exister. C'est pour cette raison qu'il est généralement conseillé d'associer plusieurs méthodes de typage afin d'augmenter la sensibilité et d'obtenir un résultat plus fiable.

Technique de séquençage de l'ADN

La méthode fondée sur ce principe actuellement la plus utilisée est la technique de *multilocus sequence typing* (MLST) qui combine le séquençage de plusieurs gènes de ménage (généralement sept) afin d'analyser l'évolution d'une espèce sur une longue période de temps. Cette méthode permet de classer les souches en « séquence types » (ST), regroupées en groupes ou complexes clonaux, et est devenue la méthode de référence pour les études phylogénétiques de collections de souches (voir le site internet : http://pubmlst.org/).

D'autres gènes sont utilisés pour le typage de certaines espèces bactériennes, comme le *spa typing* qui est fondé sur le séquençage d'une région polymorphique de la protéine A chez *S. aureus* (voir le site internet : www.spaserver.ridom). Cette dernière technique est cependant moins discriminante que le champ pulsé (*pulsed field gel electrophoresis* [PFGE]).

Malgré leur grande fiabilité, et les comparaisons interlaboratoires qu'elles permettent, ces méthodes sont limitées à une seule espèce bactérienne, ce qui oblige le laboratoire à changer de méthode pour chaque nouvelle espèce. Aussi, si elles ne révèlent aucune différence de séquence sur les gènes étudiés, cela n'exclut pas que des différences importantes existent ailleurs sur le génome des bactéries comparées, d'où un pouvoir discriminant inférieur à celui d'autres méthodes d'analyse globale du génome comme l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Il existe cependant des cas où un gène peut présenter un polymorphisme exploitable pour le typage alors que les techniques d'analyse globale du génome ne parviennent pas à différencier des souches non reliées, notamment lorsqu'elles appartiennent à un clone de

diffusion mondiale, comme c'est le cas des streptocoques du groupe A de sérotype M1.

Pour finir, ces méthodes restent onéreuses et réservées à des laboratoires spécialisés.

Technique de restriction enzymatique

Une enzyme de restriction va réaliser des coupures à chaque fois que la séquence du site spécifique (sites spécifiques caractérisés par une séquence d'ADN de 4 à 8 bases [palindrome]) est reconnue. Le nombre de coupures varie donc selon les enzymes et dépend de la fréquence avec laquelle le site reconnu est présent. La taille et le nombre de fragments d'ADN obtenus après digestion sont donc un reflet de la séquence globale du génome digéré. Ces fragments sont séparés en fonction de leurs tailles par électrophorèse en gel d'agarose. Après marquage de l'ADN par un agent intercalant fluorescent aux ultraviolets (bromure d'éthidium), un profil de bandes est obtenu, spécifique du génome digéré, semblable à un « code-barres ». Les différents profils sont comparés deux à deux et l'identité de profil entre deux souches bactériennes permet de conclure à l'identité (ou la très forte similitude) de leurs génomes, donc à un lien génétique entre les deux souches. Les différentes techniques développées sont les suivantes.

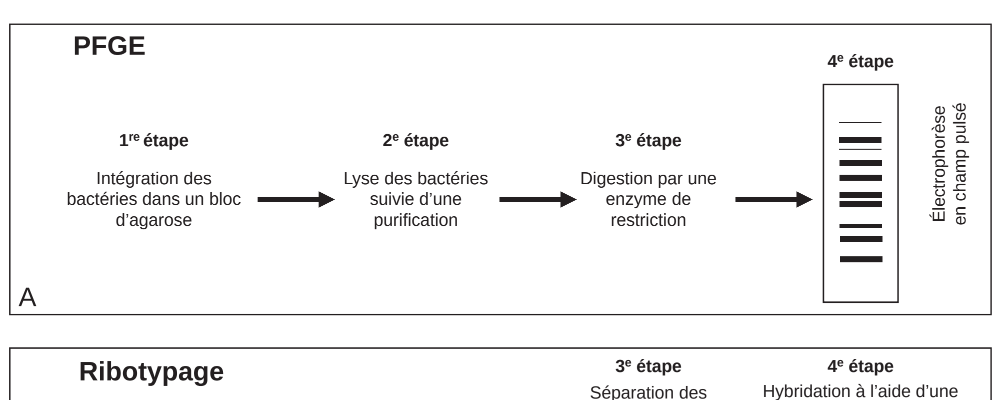
Technique de Southern et ribotypage

Les fragments d'ADN obtenus après restriction enzymatique sont hybridés avec une sonde ADN (ou ARN) marquée soit par un atome radioactif (sonde chaude), soit par une enzyme capable de transformer un substrat en molécule colorée ou émettrice de lumière (sonde froide). La sonde ne se fixant que sur les fragments d'ADN comportant la séquence complémentaire, il y aura autant de fragments rendus visibles que de copies du gène reconnu par la sonde (Fig. 3.32). Comme de nombreuses espèces bactériennes possèdent plusieurs copies des gènes des ARN ribosomaux (ARNr) sur leur chromosome (par exemple sept pour *E. coli*), l'ARNr marqué peut avantageusement servir de sonde. La technique prend alors le nom de ribotypage. Cette technique a l'avantage d'être universelle, car, les gènes des ARNr ayant peu évolué au cours du temps, la sonde d'une espèce est capable de se fixer sur les fragments d'une autre espèce proche.

Technique d'électrophorèse en champ pulsé ou *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE)

C'est la technique considérée comme le gold standard en matière de génotypage bactérien. Après digestion de l'ADN par l'enzyme, des fragments (quelques dizaines) de grande taille (centaines de kilobases) sont ainsi obtenus. Comme ces grands fragments seraient incapables de migrer dans une électrophorèse standard, le changement d'orientation du champ électrique va permettre de dérouler les fragments dans le maillage de la matrice d'agarose (Fig. 3.33A).

Cette technique universelle, très discriminante et très fiable, comporte de grands avantages. Les profils obtenus sont bien lisibles, parfaitement reproductibles, et le nombre de bandes suffisamment important pour offrir un bon reflet de l'ensemble du génome de la bactérie analysée. Toute épidémie d'importance est généralement analysée avec cette technique. Cependant, ses contraintes et le délai de rendu des résultats font qu'elle est souvent utilisée comme technique de confirmation, plutôt que comme technique de première ligne en situation d'urgence.



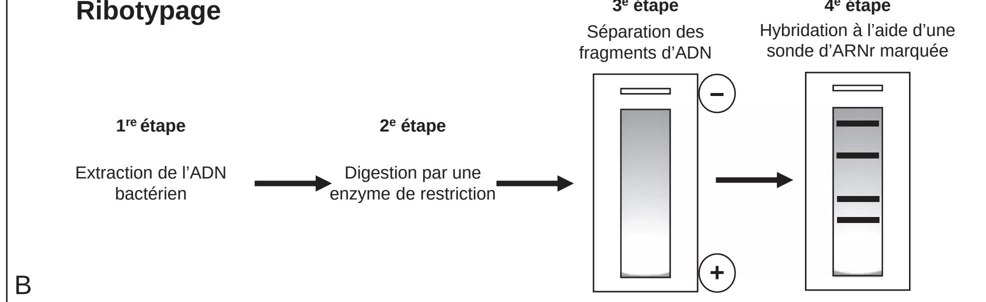


Fig. 3.32 Principe de l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) (A) et du ribotypage (B). ARNr, ARN ribosomal.

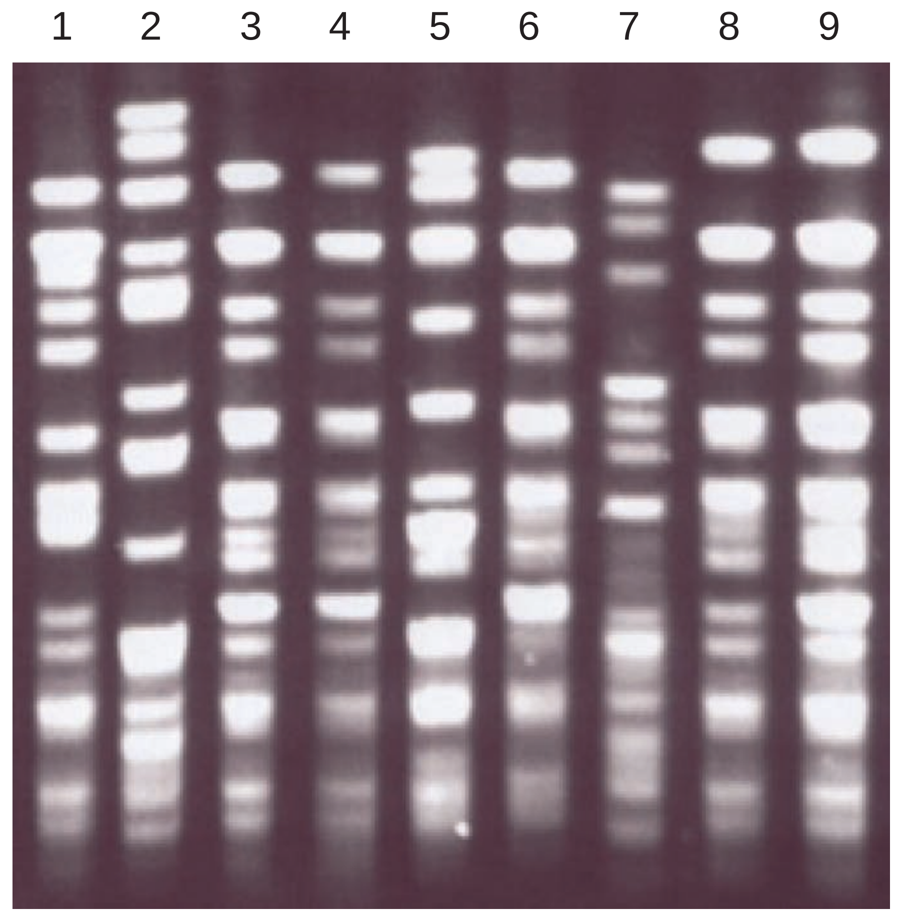


Fig. 3.33 Exemple de gel d'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) pour le typage de 9 souches d'*Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine (VanA). Les souches 3, 4 et 6 sont clonalement reliées ainsi que les souches 8 et 9. *(Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques, CHU de Caen.)*

Techniques d'amplification génique fondées sur la PCR

L'avantage de la PCR est que la plupart des laboratoires de microbiologie sont équipés du matériel nécessaire à sa réalisation. Plusieurs méthodes utilisant cette technique rapide et peu coûteuse ont été proposées pour l'adapter au typage des bactéries.

Techniques de PCR multiplexe

La combinaison de plusieurs couples d'amorces (et donc plusieurs recherches de segments d'ADN différents) est utilisée dans une même réaction. Les segments d'ADN recherchés de tailles suffisamment différentes permettent ainsi d'utiliser cette méthode comme outil de typage bactérien. Les gènes amplifiés peuvent être des gènes de virulence, des gènes de résistance aux antibiotiques, des gènes codant des antigènes de surface ou bien des séquences non codantes comme les séquences d'insertion (IS). Une variante de cette méthode est la *PCR-single nucleotid polymorphism* (SNP), qui choisit des amorces sur des mutations différenciant des allèles de gènes (si la mutation est présente, il n'y a pas d'amplification et donc disparition de la bande).

Ces méthodes sont souvent peu discriminantes et limitées à une seule espèce, ce qui les confine le plus souvent à des laboratoires spécialisés.

Technique de PCR-ribotypage

Le principe de cette technique est fondé sur le polymorphisme de longueur d'une séquence d'ADN séparant les gènes des ARNr 16S et 23S. La variation en taille de cette séquence chez certains genres (*Bacillus* et *Clostridium*) permet ainsi de l'utiliser comme outil de typage. Cette technique n'est utilisée, en biologie médicale, que pour typer l'espèce *Clostridium difficile*.

Techniques de PCR de séquences répétées (ERIC-PCR, REP-PCR, MLVA)

Le principe de ces méthodes repose sur les séquences répétées non codantes, longues de plusieurs dizaines de paires de bases, qui sont dispersées sur le génome. Certaines sont spécifiques d'une famille de bactéries comme les séquences ERIC, retrouvées chez les entérobactéries. D'autres sont ubiquitaires, comme les séquences REP. Ces séquences REP sont présentes en grand nombre sur le chromosome de la plupart des espèces bactériennes (environ 1000 copies chez *E. coli*).

Cette technique rapide pose cependant quelques problèmes résultant de l'apparition ou de la disparition de bandes lorsque l'on refait la PCR sur la même souche. Cette problématique est liée à d'infimes variations dans l'exécution de la technique. Afin de pallier ce problème, des systèmes standardisés sous forme de kits prêts à l'emploi sont actuellement commercialisés (DiversiLab™, bioMérieux) (Fig. 3.34).

Technique MLVA (*multiple-locus VNTR analysis*)

Le principe de cette technique repose sur l'utilisation du polymorphisme de séquences répétées en tandem (*variable number tandem repeat* [VNTR]), présentes, en nombre variable, en différents sites du chromosome des bactéries. D'un point de vue technique, après amplification par PCR avec des amorces spécifiques des régions d'intégration, les amplicons sont séparés en gel d'agarose : la taille des produits amplifiés varie en fonction du nombre de copies de l'élément. Cette technique peut être utilisée pour le typage des mycobactéries (*mycobacterial interpersed repetitive units* [MIRU]).

La technique MLVA est peu reproductible et peu sensible, à moins de séquencer les amplicons analysés afin de pallier les éventuelles insertions, délétions, duplications dans la région amplifiée.

Techniques de PCR aléatoire ou *random-PCR* (AP-PCR, RAPD)

Dans la PCR aléatoire, le principe repose sur l'utilisation d'une amorce unique ne comportant qu'une dizaine de bases et caractérisée par une température d'hybridation très

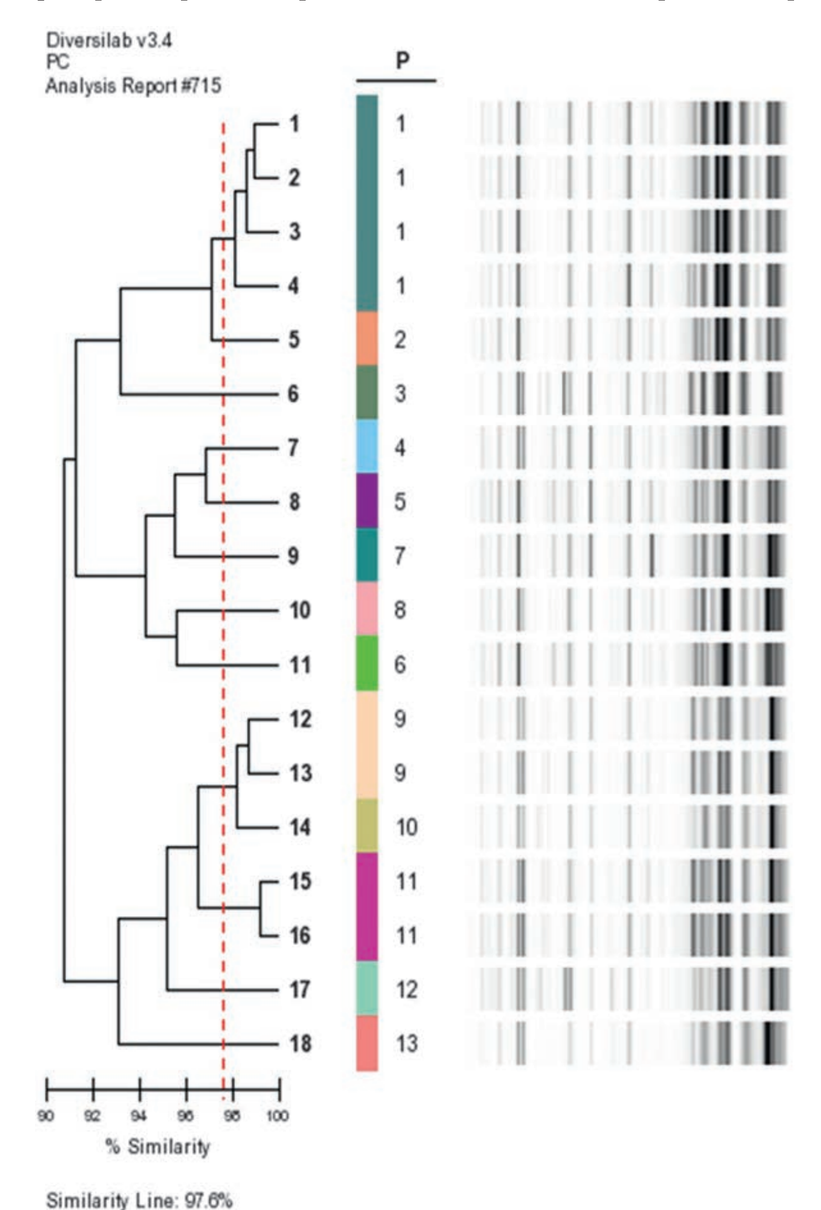


Fig. 3.34 Exemple de dendrogramme obtenu par REP-PCR (Diversilab®, bioMérieux) pour le typage de 18 souches d'*Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine (VanA). Les souches 1 à 4 sont clonalement reliées ainsi que les paires de souches 12/13 et 15/16. *(Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques, CHU de Caen.)*

basse (entre 30 et 40 °C). Dans ces conditions de faible stringence, cette petite amorce va être capable de se fixer un peu n'importe où sur le génome de la bactérie. Deux variantes de cette technique ont été développées selon la longueur de l'amorce utilisée, portant les noms de RAPD et d'AP-PCR. La technique ressemble donc à celle de la rep-PCR, sauf que, dans la PCR aléatoire, la cible sur laquelle se fixe l'amorce est inconnue. La règle est de toujours analyser l'ensemble des souches bactériennes au cours d'une seule et même série afin de s'affranchir des variations techniques (Fig. 3.33B). L'analyse des profils obtenus doit se faire avec prudence en incluant dans la série des souches témoins sans lien épidémiologique avec les souches analysées.

Techniques fondées sur le séquençage complet ou *whole genome sequencing* (WGS)

Ces techniques fondées sur le séquençage à très haut débit ou *next-generation high-throughput DNA sequencing technologies* (NGS) permettent le séquençage d'un nombre colossal de nucléotides (jusqu'à 10^{12} bases séquencées par expérience [Illumina®]) à un coût nettement moindre qu'avec la méthode de Sanger. Les fragments séquencés sont courts : actuellement de 30 à environ 250 paires de base selon la technologie. Le séquençage complet d'un génome avec les NGS conduit à un nombre colossal de petits fragments séquencés (un grand nombre de petites séquences ou lectures) que l'on essaie ensuite d'assembler en contigs. La qualité de couverture du séquençage est donc liée à celle des contigs (leur longueur et leur continuité) et donc au nombre de gaps.

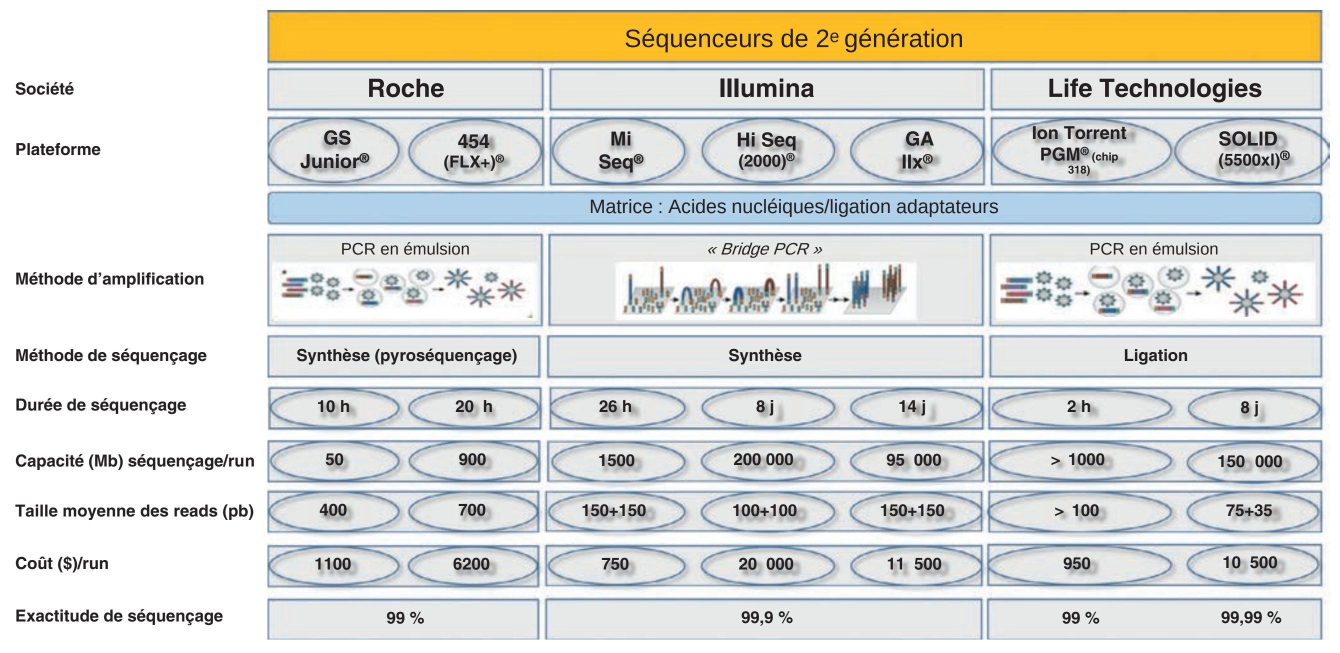
L'acquisition et la compilation d'une masse de données colossale et l'analyse des résultats des NGS nécessitent le développement d'outils bio-informatiques de plus en plus spécialisés pour assembler ces fragments en contigs.

Des technologies NGS apparaissent chaque année (plus puissantes, plus rapides, plus économiques, etc.). Les plus couramment utilisées à ce jour (Fig. 3.35) sont par exemple Illumina sequencing®, Roche 454®, Ion Torrent®, Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection®, etc.

Les NGS permettent ainsi d'aborder l'étude de la variabilité génétique et du polymorphisme de nucléotide simple SNP. Cependant, le traitement informatique du WGS nécessite de standardiser pour chaque espèce des protocoles de comparaison à partir de souches bien caractérisées. Deux approches à ce jour sont utilisées. La première correspond à une MLST étendue ou *extented MLST* (eMLST). Au lieu de réaliser l'analyse sur les 7 gènes de ménage, l'eMLST est fondée sur la comparaison de centaines ou de milliers de gènes différents.

La deuxième approche d'analyse « pangénome » repose sur la totalité des gènes d'une espèce incluant le core génome. Cette approche nécessite une base de données conséquente par espèce bactérienne. L'analyse de clonalité des souches est fondée sur la présence ou l'absence de gène(s) sur la totalité du génome bactérien. Le pouvoir discriminant de cette approche core- et pangénome est nettement plus important que la MLST. Cette stratégie d'analyse est grandement facilitée par des bases de données (*Bacterial isolate genome sequence database* [BIGSdb]), associées à des logiciels disponible sur internet (http://pubmlst.org/software/database/bigsdb/).

L'utilisation de l'approche WGS dans l'analyse d'épidémies facilite l'identification rapide et précise des facteurs de virulence du pathogène. Elle permet également de retracer le chemin de transmission d'une espèce bactérienne pathogène ou non dans une population et de fournir des informations sur la source probable.



Séquenceurs de 2e génération							
Société	Roche		Illumina			Life Technologies	
Plateforme	GS Junior®	454 (FLX+)®	Mi Seq®	Hi Seq (2000)®	GA IIx®	Ion Torrent PGM® (chip 318)	SOLID (5500xl)®
	Matrice : Acides nucléiques/ligation adaptateurs						
Méthode d'amplification	PCR en émulsion		*« Bridge PCR »*			PCR en émulsion	
Méthode de séquençage	Synthèse (pyroséquençage)		Synthèse			Ligation	
Durée de séquençage	10 h	20 h	26 h	8 j	14 j	2 h	8 j
Capacité (Mb) séquençage/run	50	900	1500	200 000	95 000	> 1000	150 000
Taille moyenne des reads (pb)	400	700	150+150	100+100	150+150	> 100	75+35
Coût ($)/run	1100	6200	750	20 000	11 500	950	10 500
Exactitude de séquençage	99 %		99,9 %			99 %	99,99 %

Fig. 3.35 Comparaison des caractéristiques des nouvelles technologies de séquençage à haut débit. *(D'après biorigami.com et avec leur autorisation).*

Choix de la technique

- Surveillance épidémiologique locale : utilisation de marqueurs polyvalents avec validation du pouvoir discriminant des marqueurs sur des souches épidémiologiquement non reliées. Les techniques habituellement utilisées sont la PFGE, la RAPD, la rep-PCR, etc.
- Surveillance nationale et globale : suivi de la prévalence et de la diffusion géographique de clones épidémiques, typage « définitif » par des marqueurs standardisés, avec comparaison possible des profils par rapport à une base de données. Les techniques habituellement utilisées sont la ribotypie, la MLST et maintenant le séquençage complet (WGS).

Conclusion

Le choix de la technique de typage moléculaire à utiliser nécessite une bonne connaissance de la bibliographie et du ou des objectifs de l'étude. Dans l'attente du développement et de la baisse des coûts de l'approche des séquençages à très haut débit, l'utilisation de plusieurs techniques permet d'informer avec une meilleure certitude la notion de clonalité de souches impliquées ou non dans une épidémie locale ou nationale.

Pour en savoir plus

Bidet, P, Barbut, F, Lalande, V, et al. Development of a new PCR-ribotyping method for Clostridium difficile based on ribosomal RNA gene sequencing. FEMS Microbiol Lett 1999 ; 175 : 261–6.

Bidet, P, Lesteven, E, Doit, C, et al. Subtyping of emm1 group A streptococci causing invasive infections in France. J Clin Microbiol 2009 ; 47 : 4146–9.

Bingen, EH, Denamur, E, Elion, J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. Clin Microbiol Rev 1994 ; 7 : 311–27.

Gilchrist, CA, Turner, SD, Riley, MF, et al. Whole-Genome Sequencing in outbreak analysis. Clin Microbiol Rev 2015 ; 28(3) : 541–63.

Maiden, MC, Bygraves, JA, Feil, E, et al. Multilocus sequence typing : a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci U S A 1998 ; 95 : 3140–5.

Robertson, GA, Thiruvenkataswamy, V, Shilling, H, et al. Identification and interrogation of highly informative single nucleotide polymorphism sets defined by bacterial multilocus sequence typing databases. J Med Microbiol 2004 ; 53 : 135–45. Pt.

Sabat, AJ, Budimir, A, Nashev, D, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. Euro Surveill 2013 ; 18(4).

Tenover, FC, Arbeit, R, Archer, G, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 1994 ; 32 : 407–15.

van Belkum, A, Scherer, S, van Alphen, L, Verbrugh, H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. Microbiol Mol Biol Rev 1998 ; 62 : 275–93.

Versalovic, J, Koeuth, T, Lupski, JR, et al. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application o fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1991 ; 19 : 6823–31.

Apports et limites actuelles de la sérologie en bactériologie

Y. Buisson

PLAN DU CHAPITRE

La sérologie a-t-elle encore sa place au laboratoire parmi les méthodes de diagnostic des infections bactériennes ? Par ses contraintes techniques, sa lenteur d'exécution, ses résultats tardifs et sa faible valeur diagnostique, n'est-elle pas condamnée à une relégation progressive, mais inéluctable face aux progrès constants de la biologie moléculaire ? Certaines méthodes de diagnostic indirect utilisées depuis plus d'un siècle répondent-elles encore aux exigences actuelles de qualité ? Au total, quel est le niveau de preuve d'une sérologie bactérienne positive aujourd'hui ? Face à ces questions, il faut considérer les principes et les limites de la sérologie bactérienne, les techniques disponibles et les avancées techniques, pour retenir finalement les applications encore utiles dans un laboratoire de microbiologie.

Principes et limites de la sérologie bactérienne

Le diagnostic sérologique (ou diagnostic indirect, ou sérodiagnostic) des infections bactériennes repose sur la mise en évidence chez l'hôte d'une réaction immunitaire spécifique de l'agent infectieux consistant en la production d'anticorps généralement détectables au bout de 8 à 10 jours. Après cette phase de latence, la cinétique de la réponse humorale comporte d'abord l'apparition d'anticorps de classe immunoglobulines M (IgM), progressivement remplacés par des anticorps de classe IgG, produits très longtemps, dont certains ont un rôle protecteur.

Une infection bactérienne expose le système immunitaire de l'hôte à une très grande variété d'antigènes, liés à la capsule, à la paroi, aux flagelles, aux pili, ou extracellulaires (enzymes, toxines), et suscite une réponse humorale polyclonale diversifiée ciblant de nombreux épitopes différents. De plus, la présence d'anticorps n'est pas toujours détectable, l'intensité de la réponse variant suivant le site de multiplication extra- ou intracellulaire de l'agent pathogène, le caractère localisé ou invasif du processus infectieux et l'état immunitaire de l'hôte.

Des structures antigéniques proches ou identiques peuvent se trouver à la surface de bactéries pathogènes d'espèces différentes, à l'origine de réactions croisées au sein du même genre (par exemple la sérologie des rickettsioses) ou entre espèces appartenant à des genres différents (par exemple entre *Brucella* spp., *Yersinia enterocolitica, Vibrio cholerae* et *Francisella tularensis*).

La détection d'anticorps spécifiques d'une bactérie pathogène à des fins diagnostiques peut donc se heurter à plusieurs obstacles principaux : les résultats sont disponibles plus d'une semaine après le début de l'infection ; ils sont à interpréter au sein d'une réponse immunitaire complexe et protéiforme ; certaines techniques manquent de sensibilité, et parfois de spécificité à cause des réactions croisées.

C'est pourquoi le recours à la sérologie bactérienne doit faire appel à des méthodes bien standardisées et à des techniques dont la valeur diagnostique a été formellement établie [4].

Techniques disponibles

La présence d'anticorps spécifiques est recherchée le plus souvent dans le sérum, après centrifugation d'un échantillon de 5 à 10 ml de sang veineux prélevé sur tube sec. Il est recommandé de recueillir deux échantillons prélevés à 10 à 20 jours d'intervalle, pour détecter une séroconversion ou une ascension significative du titre des anticorps, et de conserver les sérums à –20 °C pendant une année au moins.

Les méthodes de la sérologie bactérienne ont beaucoup évolué depuis plus d'un siècle, les principaux progrès s'appliquant à la présentation de l'antigène (bactéries entières, fractions antigéniques purifiées ou épitopes isolés), à l'identification des différentes classes d'immunoglobulines (IgG, IgM, IgA surtout) et aux procédés de détection des anticorps :

- la précipitation en milieu liquide ou gélifié, utilisant un antigène soluble, peut s'appliquer à l'identification de certaines toxines bactériennes, comme dans le test d'Elek (immunoprécipitation en milieu gélifié pour la détection de la toxine diphtérique) qui tend à être remplacé par une méthode de biologie moléculaire (amplification du gène *tox*);
- l'agglutination s'applique aux antigènes particulaires et détecte surtout les IgM. Elle est simple et rapide à réaliser, mais peu sensible, peu spécifique et sujette à la subjectivité du lecteur. C'est pourquoi les classiques réactions de Widal et Félix pour les fièvres typhoparatyphoïdiques et de Wright pour la brucellose sont quasi abandonnées. L'agglutination passive d'érythrocytes ou de particules de latex sensibilisés par un antigène présente les mêmes qualités et les mêmes défauts. En raison de sa bonne spécificité, le TPHA (*treponema pallidum haemagglutination assay*) garde toute sa place dans le diagnostic de la syphilis;
- la réaction de fixation du complément (RFC) est longue et délicate à mettre en œuvre, difficile à standardiser, spécifique mais peu sensible. Supplantée par des méthodes plus performantes, elle est de moins en moins utilisée, sauf en tant que test de confirmation comme pour les infections à mycoplasmes;
- l'immunofluorescence indirecte (IFI) est sensible et spécifique. C'est la technique de référence pour le diagnostic indirect des infections à germes intracellulaires (*Brucella, Coxiella, Rickettsia, Brucella, Bartonella*, etc.), mais non automatisable, elle est inadaptée aux grandes séries et sujette à la subjectivité du lecteur;
- l'immunoenzymologie (ELISA), sensible et spécifique, a de nombreuses applications. Elle est automatisable; elle convient aux grandes séries, mais n'est pas adaptée au dosage des anticorps;
- l'immuno-empreinte (*Western-blot*) est moins sensible que l'ELISA mais très spécifique car elle distingue les anticorps réactifs vis-à-vis des différents antigènes cibles. Elle est automatisable et sert surtout de test de confirmation.

Actuellement, les méthodes les plus utilisées sont l'IFI ou l'ELISA pour détecter les anticorps, et le western-blot pour en confirmer la spécificité.

Avancées techniques

- *Pour le prélèvement et le transport*, le recueil d'échantillons de sang séché sur papier buvard permet de s'affranchir des contraintes de stockage et de transport, et de différer l'analyse sérologique sur l'éluat. Cette méthode, surtout mise à profit dans les enquêtes séro-épidémiologiques sur des maladies virales et parasitaires, a été appliquée à quelques infections bactériennes, notamment les brucelloses, les tréponématoses, les leptospiroses et certaines rickettsioses [6].
- *Pour la détection simultanée d'anticorps de spécificité différente*, différentes techniques de multiplexage ont été développées dans le domaine de la sérologie, utilisant la technologie Luminex® ou les puces à antigènes, avec des applications notamment dans le diagnostic des infections à *Helicobacter pylori* [5].
- *Pour une réponse rapide au lit du malade*, la détection d'anticorps spécifiques par des tests rapides d'orientation diagnostique (TROD) peut s'appliquer à certaines infections bactériennes. À côté des anciennes agglutinations sur lame, comme l'épreuve à l'antigène tamponné coloré au rose Bengale pour détecter les cas de brucellose, des tests immunochromatographiques sont utilisables, par exemple pour le dépistage de la syphilis [2].

Applications utiles

- *Pour le diagnostic des infections bactériennes* (diagnostic indirect), la sérologie garde une place lorsque la culture conventionnelle n'est pas réalisable ou délicate, notamment en cas d'infections pulmonaires (*Coxiella burnetii*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* spp.) ou systémiques (brucellose, syphilis, maladie de Lyme, rickettsioses, bartonelloses) [7]. Le tableau 4.1 indique les sérologies pertinentes ayant une preuve scientifique établie (grade A), celles qui ont un faible niveau de

Tableau 4.1 **Pertinence des recherches de sérologies bactériennes dans un contexte d'infection bactérienne (adapté de REMIC 2015)**

Sérologies utiles	Sérologies utiles selon le contexte	Sérologies inutiles
Bartonella spp.	Campylobacter (arthrite réactionnelle, syndrome de Guillain-Barré)	*Bordetella pertussis*
Brucella spp.	*Chlamydia trachomatis*	*Haemophilus* spp.
Borrelia spp. (confirmation avec *Western-blot*)	*Chlamydia psittaci*	*Klebsiella* spp.
Coxiella burnetii	*Chlamydia pneumoniae*	*Listeria* spp.
Francisella spp.	*C. diphtheriae**, *C. tetani**	Mycoplasmes génitaux
Helicobacter pylori (enfant)	*Helicobacter pylori* (adulte)	*Neisseria gonorrhoeae*
Legionella spp.	*S. pneumoniae***	*Pasteurella* spp.
Leptospira spp.	*Mycoplasma pneumoniae*	*Shigella* spp.
Rickettsies	*Salmonella*	Staphylocoques
Treponema pallidum	*Yersinia* (arthrites réactionnelles, syndrome de Guillain-Barré)	*Streptocoques* (*ASLO, ASDornase*)
		Tuberculose, mycobactérioses
		Pseudomonas aeruginosa, infection pulmonaire chez un sujet atteint de mucoviscidose

* Dosage anticorps antitoxines (post-vaccinaux).
** Dosage anticorps anticapsulaire (post-vaccinaux).

preuve scientifique (grade C) et celles qui n'ont plus lieu d'être, prescrites parce que devenues inutiles et n'étant plus inscrites à la nomenclature des actes de biologie [4].

- *Pour le contrôle du statut immunitaire* : la question se pose surtout au sujet du tétanos dans les services d'accueil des urgences (SAU) pour apprécier le statut vaccinal d'un blessé et la nécessité d'une vaccination antitétanique complétée ou non par l'administration d'immunoglobulines. Le manque de fiabilité de l'interrogatoire du patient et l'absence de carnet vaccinal (dans 90 à 95 % des cas) ont conduit la majorité des SAU français à utiliser des tests immunochromatographiques rapides pour une évaluation semi-quantitative du taux d'anticorps antitétaniques, la valeur seuil de 0,1 UI/ml définissant le taux minimal de protection fixé par l'OMS. Toutefois, comparés au test de référence (ELISA), ces TROD ne présentent pas encore les performances requises pour bénéficier d'une inscription administrative [3].
- *Pour les enquêtes épidémiologiques* (séro-épidémiologie) : la détermination du taux de prévalence des anticorps dirigés contre certains pathogènes dans une population donnée est un outil épidémiologique précieux pour orienter des actions de santé publique contre une grande variété de maladies infectieuses (brucelloses, rickettsioses, légionelloses, leptospiroses, etc.). Dans le cas des maladies évitables par la vaccination, les enquêtes sérologiques prévaccinales estiment la proportion de sujets susceptibles ou protégés vis-à-vis d'un agent infectieux dans la population. Les études post-vaccinales permettent de mesurer l'immunogénicité d'un vaccin ou d'évaluer le niveau de protection d'une population [1].

Références

[1] Haus-Cheymol R, Mayet A, Koeck JL, et al. Intérêts et limites des études séro-épidémiologiques en vaccinologie. Rev Fr Lab 2006 ; 381 : 53–6.

[2] Haute Autorité de Santé. Évaluation a priori du dépistage de la syphilis en France. Recommandation en santé publique. Mai 2007. www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/synthese_evaluation_a_priori_du_depistage_de_la_syphilis_en_france_2007_07_02__12_22_51_493.pdf.

[3] Haute Autorité de Santé. Mise en évidence de l'immunoprotection antitétanique en contexte d'urgence. Évaluation des tests rapides immunochromatographiques. Note de cadrage ; 2009. www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2009-12/mise_en_evidence_de_limmunoprotection_antitetanique_en_contexte_durgence-note_de_cadrage.pdf.

[4] Laudat P. Sérologie et infections bactériennes « Statut vaccinal ». In : REMIC 2015. Référentiel en microbiologie médicale. 5e éd. SFM Éditeur. p. 53–9.

[5] Michel A, Waterboer T, Kist M, et al. Helicobacter pylori multiplex serology. Helicobacter 2009 ; 14(6) : 525–35.

[6] Smit PW, Elliott I, Peeling RW, et al. An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. Am J Trop Med Hyg 2014 ; 90(2) : 195–210.

[7] Taoudi ND, Maslin J, Dubrous P, et al. Apport et limites des sérologies bactériennes en pathologie infectieuse. Rev Fr Lab 2004 ; 366 : 37–43.

Chapitre 5

Tests de diagnostic rapide (TDR) en bactériologie

C. Isnard, F. Guérin, V. Cattoir

PLAN DU CHAPITRE

Introduction

Un test de diagnostic rapide (TDR) est un test qui permet d'établir rapidement (en quelques minutes ou dizaines de minutes) le diagnostic d'une maladie. Les techniques utilisées doivent répondre aux critères suivants : simplicité, rapidité et coût le plus bas possible.

À ce jour, il n'existe pas de définition normative concernant les TDR, que ce soit en termes de temps de réalisation, de pré-analytique, de compétences ou de technique mise en œuvre. Ceci étant, les kits commercialisés sont considérés comme des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (DMDIV) avec un marquage « CE » et, par ce fait, sont soumis à réglementation au niveau européen (directive 98/79/CE). Ces TDR de bactériologie, qu'ils soient réalisés au sein du laboratoire d'analyses médicales ou dans les services cliniques (biologie délocalisée), sont sous la responsabilité des biologistes médicaux et doivent répondre aux exigences de la norme NF EN 15189 (laboratoire de biologie médicale) ou de la norme NF EN 22870 (biologie délocalisée).

L'apposition du marquage « CE » est la garantie de la conformité à des exigences essentielles de conception, de fabrication et de conditionnement, liées aux aspects de sécurité et de performance des produits. Cependant, la mise sur le marché de ces dispositifs s'effectue sans contrôle a priori, après simple notification aux autorités compétentes par le fabricant ou son mandataire. De fait, il est fortement recommandé aux biologistes de maîtriser les performances mentionnées sur les notices, en étant vigilant quant aux références bibliographiques et aux qualités des kits (spécificité, sensibilité et valeurs prédictives négative [VPN] et positive [VPP]).

Ce chapitre se limite aux tests fondés sur des techniques immunologiques et aux tests faisant appel à la biologie moléculaire en temps réel sans traitement pré-analytique et potentiellement réalisables au lit du malade. Comme il n'est pas possible de passer en revue toutes les trousses utilisant les différentes techniques, nous développerons seulement les recherches les plus usuelles avec les stratégies diagnostiques associées en passant brièvement en revue les performances et les limites de chaque recherche.

TDR utilisés pour les diarrhées infectieuses

Recherche de *Clostridium difficile*

Le diagnostic microbiologique des infections à *C. difficile* repose sur la mise en évidence soit des toxines ou des gènes les codant directement à partir des selles diarrhéiques, soit du caractère toxinogène d'une souche isolée en culture. En effet, seules les souches toxinogènes sont pathogènes. De nombreux tests sont disponibles, certains permettant de détecter les toxines, d'autres mettant en évidence l'un des composants bactériens (par exemple glutamate déshydrogénase [GDH]), et certains montrant la présence des gènes codant les toxines (méthodes moléculaires, Fig. 5.1).

La GDH est une enzyme produite par les souches de *C. difficile*. La détection de cette enzyme par des tests immuno-enzymatiques (EIA) dans les selles permet de renseigner sur la présence de la bactérie. Cette méthode est sensible (de l'ordre de 90 % comparativement à la culture) mais manque de spécificité. En effet, la GDH est produite aussi bien par les



Fig. 5.1 Exemple d'automate de PCR en temps réel (GeneXpert®, Cepheid). *(Photographie : Michel Auzou.)*

souches toxinogènes que les souches non toxinogènes. Elle représente donc un bon marqueur de la présence de *C. difficile* dans les selles, mais ne permet pas de prédire le caractère pathogène de la souche qui devra être confirmé ou infirmé par un second test. La GDH représente donc une bonne méthode de dépistage avec une excellente VPN ; un résultat négatif permet d'exclure le diagnostic d'infection à *C. difficile* (Fig. 5.2). Pourtant, il a été récemment rapporté que la sensibilité de cette méthode de détection dépendrait du type de souche. En effet, selon le PCR-ribotype concerné, la sensibilité des algorithmes utilisant la GDH pourrait varier : elle serait significativement plus faible que celle de GeneXpert® pour les PCR-ribotypes autres que 027. Ces résultats préoccupants méritent d'être confirmés par d'autres études.

Recherche de *Campylobacter* spp.

Les espèces du genre *Campylobacter* sont responsables de nombreuses diarrhées d'origine alimentaire chez l'homme et représentent la cause bactérienne la plus fréquente de gastro-entérites dans le monde. Dans les pays développés et en développement, elle provoque plus de cas de diarrhée que les bactéries du genre *Salmonella* pouvant être transmises par les aliments. Des TDR fondés sur des réactions immunologiques permettent uniquement la détection des espèces *C. jejuni* et/ou *C. coli*. La spécificité de ces tests est comprise entre 73 et 83 % avec une spécificité de 97 %. Ces TDR peuvent constituer une alternative efficace dans la prise en charge thérapeutique des patients, surtout aux urgences, pour les gastro-entérites infectieuses de l'enfant.

Recherche d'*Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)

De nombreux tests immunologiques permettent la détection des EHEC directement dans les selles ou après une phase d'enrichissement en bouillon. Ces tests détectent l'antigène O157 et/ou les toxines Stx. Ils sont faciles à mettre en œuvre et constituent, lorsqu'ils sont positifs, une alerte pour le clinicien ; cependant, bien qu'ayant de bonnes sensibilité et spécificité, leur lecture est parfois difficile et ils peuvent donner des résultats faussement positifs par des réactions croisées avec des virus entériques ou d'autres bactéries. Ils doivent toujours être confirmés par des méthodes moléculaires. Par ailleurs, il faut garder en mémoire que ces tests fondés sur la shigatoxine Stx1 croisent en cas de diarrhées à *Shigella dysenteriae* sérotype 1.

Recherche de *Shigella* spp.

Des tests pour le diagnostic des shigelloses à *S. flexneri* sérotype 2a, à *S. dysenteriae* sérotype 1 et à *S. sonnei* sont actuellement commercialisés. Ces TDR sont fondés sur la détection de polysaccharides et plus particulièrement de l'antigène somatique O, constitué d'unités répétées d'oligosaccharides définissant le sérotype. En termes de sensibilité et de spécificité, elles sont respectivement pour ces trois tests comprises entre 91 et 100 % et 95 et 99 %.

Techniques d'amplification des acides nucléiques (TAAN) pour la recherche des agents infectieux impliqués dans les diarrhées infectieuses

Une approche différente a été développée par Beckton Dickinson pour la recherche rapide en moins de 3 heures des principaux agents bactériens responsables de diarrhées : BD MAX® Enteric Bacterial Panel qui permet la détection de *Campylobacter* spp. (gène cible *tuf*), *Salmonella* spp. (gène cible *SpaO*), *Shigella* spp., d'EHEC (gène cible *stx1*/*stx2*) et d'*E. coli* entéro-invasif (EIEC ; gène cible *ipaH*). Cette trousse permet de retrouver l'étiologie des principaux agents de diarrhées infectieuses même en cas de traitement antibiotique. Ce test présente quelques réactions faussement négatives : *stx2f* variant, etc. Un résultat négatif ou positif nécessite une confirmation par culture pour infirmer ou confirmer la présence ou l'absence d'un agent infectieux en fonction de la gravité de la diarrhée.

Recherche de *Vibrio cholerae*

Le choléra est une diarrhée hydrique sévère épidémique, causée par certains sérotypes de *V. cholerae* (O1 ou O139) producteurs de la toxine cholérique. Pour pallier la technique de référence par culture, des TDR sont commercialisés. Selon les fournisseurs et les études, les sensibilités et spécificités s'échelonnent respectivement de 65 à 100 % et de

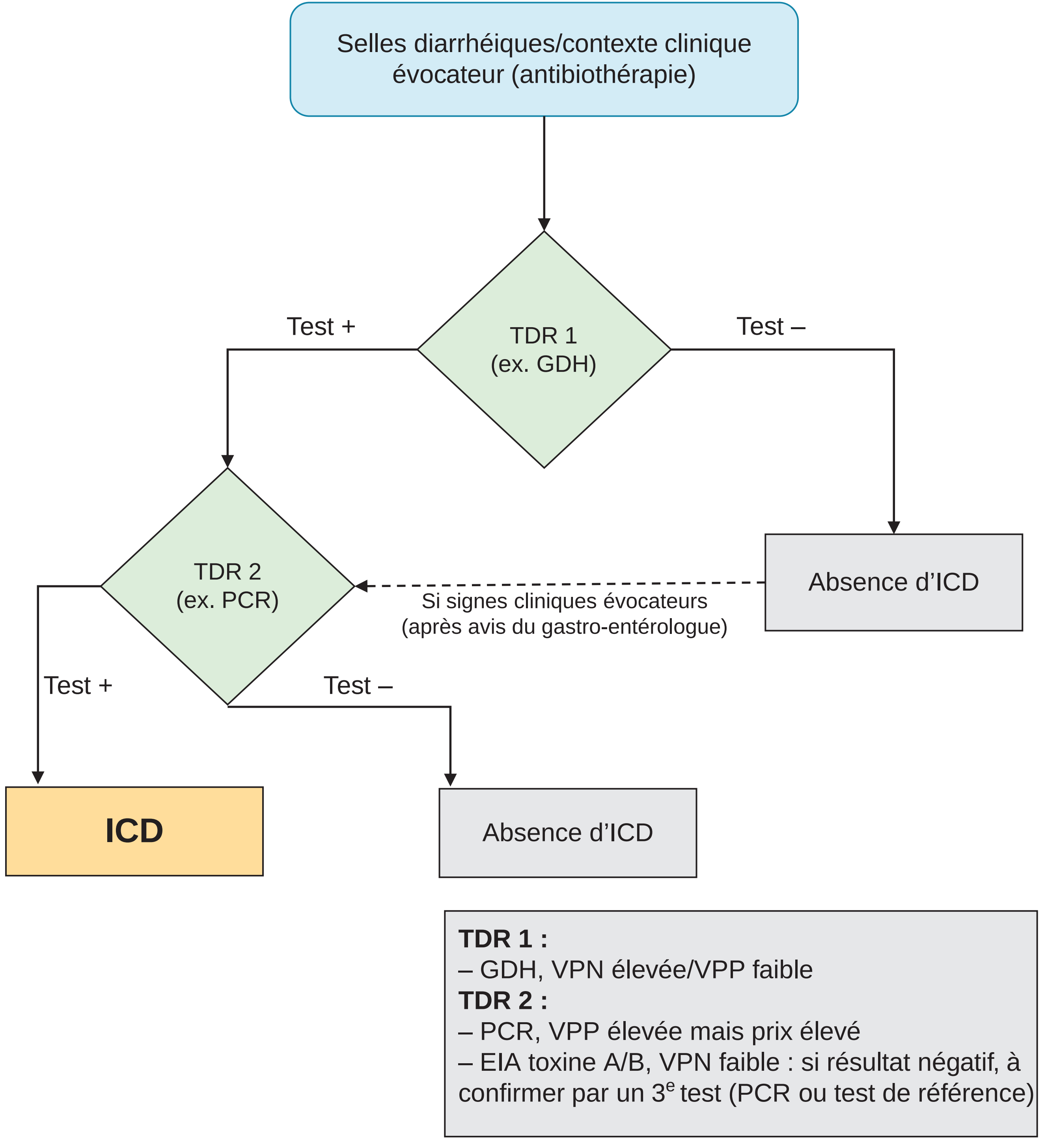


Fig. 5.2 Algorithme de diagnostic des infections à *Clostridium difficile* (ICD). EIA : *enzyme immunoassay*; GDH : glutamate déshydrogénase; TDR : test de diagnostic rapide; VPN : valeur prédictive négative. VPP : valeur prédictive positive. *(D'après Eckert et al. 2011.)*

44 à 100 %. À noter que les valeurs de 100 % de sensibilité et de spécificité ne sont atteintes que dans des petites séries et généralement après une étape d'enrichissement des échantillons. Selon de nombreux auteurs, ces TDR ne permettent pas d'affirmer, ni d'éliminer un diagnostic de choléra directement à partir des selles. Quoi qu'il en soit, un contexte clinique évocateur nécessite la recherche par culture en cas de TDR négatif. De même, un test positif nécessite une confirmation par la technique de référence.

Recherche d'*Helicobacter pylori*

La recherche d'antigènes d'*H. pylori* à partir des selles par anticorps monoclonaux identifie une infection active avec

d'excellentes VPN (environ 90 %) et VPP (environ 93 %) avant et après traitement. Ce test est recommandé pour le diagnostic et le contrôle de l'éradication, si le test respiratoire n'est pas réalisable. La nécessité de recueillir et manipuler des selles puis de conserver le prélèvement au frais jusqu'à son analyse est un obstacle à la diffusion de cette méthode.

TDR utilisés pour les pneumopathies infectieuses

Recherche de *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae est une espèce bactérienne à l'état commensal au niveau du rhinopharynx chez 5 à 10 % des adultes et 20 à 40 % des enfants, pouvant être responsable d'infections sévères (pneumopathie, méningite, bactériémie, etc.). Un TDR par immunochromatographie sur membrane (test Binax NOW® de dépistage de l'antigène urinaire de *S. pneumoniae*) a été validé sur des échantillons d'urines chez des patients présentant un tableau clinique de pneumopathie. Ce test détecte l'antigène soluble C-polysaccharidique pneumococcique, antigène de membrane commun à tous les sérotypes. La recherche de l'antigénurie pneumococcique Binax Now® ou ICT test a une bonne sensibilité et une bonne spécificité diagnostique. Une étude italienne a évalué la sensibilité à 77 % et la spécificité à 99 %. Ceci étant, les sensibilités dans les pneumonies aiguës communautaires (PAC), bactériémiques ou non, varient respectivement de 77 à 89 % versus 44 à 69 % selon les études. À noter que la présence de faux positifs est rare chez l'adulte et qu'un résultat peut rester positif plusieurs semaines (jusqu'à 1 à 2 mois). Ce TDR est essentiellement recommandé dans les PAC graves de l'adulte nécessitant une réanimation, permettant ainsi d'établir des diagnostics supplémentaires pour 15 à 20 % des cas.

La sensibilité et la spécificité dans les PAC de l'enfant sont comprises respectivement entre 88 et 100 % et 55 et 80 %. À noter la présence de nombreux faux positifs (la vaccination récente peut être responsable d'une positivité du test). La VPN chez l'enfant dans cette pathologie infectieuse est excellente à 100 %. Ainsi, un test négatif exclut de façon quasi certaine une infection à pneumocoque. En revanche, un test positif est ininterprétable, pouvant être dû à un portage.

Ce TDR peut également être utilisé dans la recherche des antigènes solubles dans le liquide céphalorachidien (LCR). La sensibilité et la spécificité sont comprises respectivement entre 95 et 100 % et plus de 99 %. Ce test est fortement recommandé sur le LCR, lorsque le contexte clinique est évocateur d'une méningite bactérienne, en particulier lorsque l'examen direct du LCR est négatif.

N.B. : ce TDR, pour rappel, est uniquement validé pour les natures de prélèvements suivants : urines et LCR. Pour les autres natures de prélèvement (par exemple liquide pleural, liquide articulaire), la validation de la méthode devra être argumentée.

Recherche de *Legionella pneumophila*

La légionellose, infection provoquée par *L. pneumophila*, est une étiologie commune de pneumonies communautaires et nosocomiales. Les légionelles sont des bactéries intracellulaires facultatives à Gram négatif, à tropisme hydrique, largement répandues dans la nature. La recherche d'antigènes urinaires est primordiale, car elle permet un dépistage très précoce des cas à *L. pneumophila* sérogroupe 1. Les antigènes détectés sont des lipopolysaccharides de la membrane externe des légionelles. L'excrétion est longue mais variable selon les patients : de quelques jours à 2 mois en moyenne, et à plus d'un an chez certains patients. La durée d'excrétion des antigènes peut être un facteur limitant le diagnostic de légionellose lors de pneumonies récidivantes. Devant toute recherche d'antigène urinaire positive et en présence d'une pneumonie, la légionellose est confirmée, mais l'isolement d'une souche par la mise en culture d'un prélèvement clinique reste indispensable pour l'enquête épidémiologique. En cas de suspicion de légionellose, tout prélèvement bronchopulmonaire doit être ensemencé même en l'absence de polynucléaires.

Les TDR recommandés par le Centre national de référence (CNR) présentent des particularités à respecter : concentration des urines (Alere BinaxNOW®, Legionella Urinary Antigen Card), chauffage des urines en cas de test positif (Legionella V-test®, Coris) (Fig. 5.3).

TDR utilisés pour les angines

Deux techniques, la culture et les TDR, existent pour confirmer le diagnostic d'infection à *Streptococcus pyogenes*. La culture demande un délai de 1 à 2 jours. Les TDR actuels sont simples de réalisation, ne nécessitant qu'un bref apprentissage, et sont réalisables en 5 à 10 minutes.

Leurs bonnes spécificité et sensibilité (>90 %) traduisent un risque faible de faux positifs. Tout test positif justifie donc un traitement antibiotique sans nécessité de contrôle bactériologique. Un TDR positif transforme pour le clinicien un syndrome (association de symptômes et aspect évocateur de la gorge) en une maladie dont le diagnostic est défini, les modalités thérapeutiques et l'évolution connues.

Un seul TDR est en général suffisant. Cependant, chez certains patients dont le TDR est négatif, si les symptômes (fièvre notamment) persistent au-delà de 3 jours, un deuxième TDR ou un prélèvement bactériologique peut être envisagé.

La recherche des antigènes de *S. pyogenes* par des TDR directement dans les liquides de ponction est en cours d'évaluation et semble améliorer la prise en charge thérapeutique.

TDR utilisés pour les infections urogénitales

Chez un individu symptomatique, la culture est la méthode de référence pour le diagnostic de *Neisseria gonorrhoeae*. La culture peut être associée à l'utilisation de TAAN : si les conditions de transport risquent d'affecter la survie des pathogènes pour la mise en culture (principalement, délai d'acheminement et température) notamment dans les localisations rectales et pharyngées. Les souches isolées par culture doivent faire l'objet d'une analyse de sensibilité aux antibiotiques.

Dans un contexte de dépistage, la culture n'est pas adaptée ; chez un individu asymptomatique, il est préconisé d'employer des tests TAAN multiplex *N. gonorrhoeae/Chlamydia*



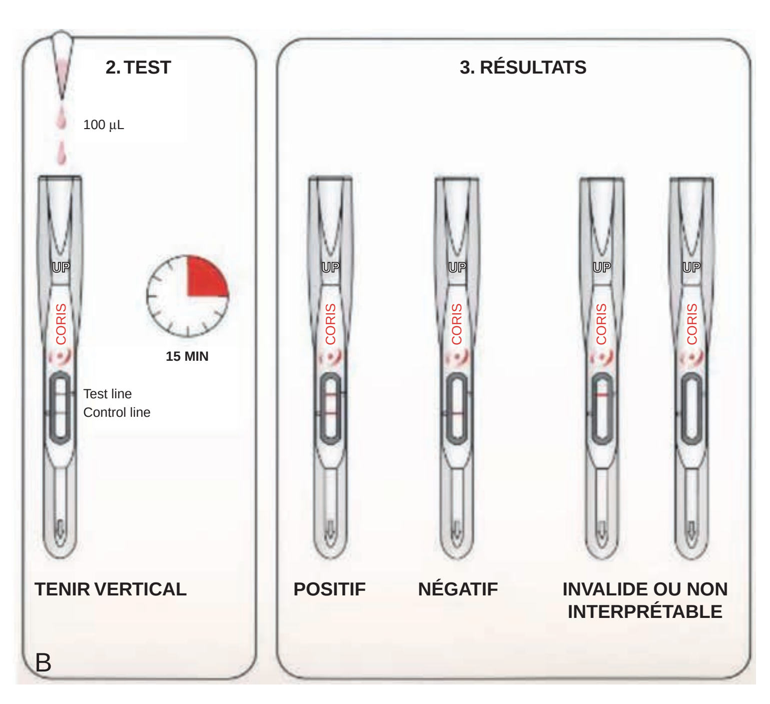


Fig. 5.3 Exemples de TDR utilisés pour la recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila* sérogroupe I. A. Binaxnow Legionella® (Alere). **B.** Legionella V-test® Coris (Eurobio). *(Photographie : Michel Auzou.)*

trachomatis, quel que soit le site du prélèvement (génital, anal ou pharyngé). Les TDR utilisant les techniques immunologiques sont à éviter du fait de leur faible sensibilité. La majorité des fournisseurs commercialisent des tests pour la plupart en série et nécessitant une extraction de l'ADN ou ARN bactérien.

La comparaison des résultats du kit Xpert CT/NG® (Cepheid) versus deux autres méthodes de TAAN donne des résultats, que ce soit pour *C. trachomatis* ou *N. gonorrhoeae*, de sensibilité et de spécificité en fonction des prélèvements comprises respectivement entre 97 et 100 % et supérieure à 99 %.

TDR utilisés pour la recherche de mycobactéries

La culture de *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) est le diagnostic de référence de la tuberculose (TB). Elle nécessite un niveau d'infrastructure, de sécurité (niveau BL3) et d'expertise disponible seulement dans certains laboratoires de référence. Le développement de méthodes PCR en temps réel en circuit fermé et automatisées, comme le test Xpert MTB/RIF® (Cepheid), a révolutionné la prise en charge des patients suspects de TB, permettant le diagnostic ultrarapide de TB pulmonaire ou extrapulmonaire (1 h 30 versus 2 à 4 semaines en culture). Grâce à une limite de détection d'environ 100 colonies/ml de crachat, dans une étude prospective multicentrique, la sensibilité du Xpert MTB/RIF® variait entre 72 et 92 % chez les patients BAAR négatifs selon que le test était réalisé sur un, deux ou trois crachats avec une spécificité de 99 %. Ce test permet aussi la détection concomitante de la résistance à la rifampicine. Bien que sa technologie soit très avancée, il est simple d'utilisation, nécessite peu de manipulations et a un risque faible de production d'aérosol, ce qui permet en théorie son utilisation par du personnel peu qualifié.

Parmi les tests antigéniques, le lipoarabinomannane (LAM) a été le plus évalué et est déjà commercialisé sous la forme d'une bandelette urinaire (Alere Determine™ TB LAM Ag). Dans les contextes à haute prévalence de TB, la sensibilité du LAM variait entre 17 et 40 % selon les études. Néanmoins, plusieurs études ont retrouvé une meilleure sensibilité du test chez les patients VIH positifs avec moins de 100 CD4/mm³, tout en conservant une très bonne spécificité, probablement en raison de l'atteinte glomérulaire facilitant le passage transrénal de l'antigène. Des premiers résultats sont encourageants pour une éventuelle utilisation du test LAM dans le liquide céphalorachidien pour le diagnostic de méningite tuberculeuse.

TDR utilisés pour la recherche de germes pathogènes ou des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe)

Streptococcus agalactiae

Chez l'homme, les streptocoques du groupe B (SGB) sont des commensaux des voies génitales et de l'intestin, éventuellement responsables d'infections néonatales très sévères (septicémies, méningites). La recherche de SGB par culture est recommandée entre la 34e et la 37e semaine d'aménorrhée, sauf en cas d'antécédents d'infection à *S. agalactiae* ou de bactériurie en cours de grossesse. Les TDR peuvent aussi être utilisés chez les femmes à terme au statut de portage

inconnu. Les TDR disponibles utilisent des techniques immunologiques (sensibilité 47 % à 94 % ; spécificité 85 % à 96 %) ou des TAAN (sensibilité 97 % ; spécificité 100 %).

Staphylococcus aureus résistant à la méticilline (SARM) – portage

Le dépistage de SARM permet dans certains contextes épidémiologiques de prendre des mesures d'hygiène rapides et d'éviter toute dissémination de clones hospitaliers ou communautaires. Plusieurs kits de TAAN automatisés sont à ce jour commercialisés : BD Max MRSA XT® (Beckton Dickinson) et Xpert SA Nasal complete® (Cepheid). Ces techniques de PCR en temps réel sont fondées au moins sur la détection d'un gène spécifique de l'espèce (*spa*) et du gène *mecA* voire *mecC* pour la plus performante (BD Max®). Ces techniques sont sensibles et spécifiques. À noter que les kits Cepheid ne détectent pas actuellement le gène *mecC* (résultat faussement négatif).

Cette technique est adaptée aux prélèvements de pus profond et aux hémocultures positives à cocci à Gram positif évoquant un staphylocoque ainsi que la détection de SARM au niveau nasal.

Recherche des BHRe

La recherche des BHRe est fortement recommandée dans les établissements de santé, chez les patients rapatriés de pays à risque (instruction n° DGOS/PF2/DGS/RI1/2014/08 du 14 janvier 2014 relative aux recommandations pour la prévention de la transmission croisée des BHRe). Le laboratoire, afin de répondre à ces recommandations, doit mettre en œuvre une ou des techniques pour détecter ces BHRe. Les TAAN constituent une alternative aux techniques conventionnelles (cultures sur gélose sélective ou chromogénique). Elles permettent rapidement, dans ce contexte épidémiologique préoccupant, de mettre en œuvre les dispositions d'hygiène hospitalière adaptées en cas de patient suspect. La recherche peut être effectuée directement à partir d'un écouvillonnage rectal en vérifiant la conformité du prélèvement (présence de matières fécales) ou de selles.

Enterococcus faecium vanA ou vanB

Une PCR temps réel est commercialisée par Cepheid sur le système GeneXpert (Xpert® VanA/VanB). Ce test permet en moins d'une heure de renseigner sur le portage ou non de ce type de BHRe. La sensibilité, la spécificité et la VPP de ce test sont bonnes pour *vanA* (100 % et 99 %) et *vanB* (100 % et 85 %), mais la VPP reste limitée ou médiocre (67 % pour *vanA* et seulement 3 % pour *vanB*). C'est dû au fait que les anaérobies du microbiote intestinal constituent un réservoir de ces gènes (notamment pour *vanB*). Ainsi, tout résultat positif doit être confirmé ou infirmé par une culture sur gélose sélective.

Bactéries productrices de carbapénémase

Une PCR commercialisée également par Cepheid sur le système GeneXpert (Xpert® Carba-R) est commercialisée. Elle permet la détection des gènes prévalents : *KPC*, *NDM*, *VIM*, *IMP-1*, *OXA-48*, *OXA-181* et *OXA-232*. La sensibilité et la spécificité sont bonnes (93 % et 99 % respectivement). Cependant, un résultat négatif n'exclut pas un autre gène non mis en évidence par ce kit. De plus, tout test positif doit être confirmé par une culture sélective.

Conclusion

Les TDR sont des outils performants utilisés dans les conditions définies par les fournisseurs et dans le respect des algorithmes des sociétés savantes de microbiologie. Le développement des TAAN permet déjà de réaliser une approche de la prise en charge infectieuse par pathologie : digestive, génitale, etc.

Pour en savoir plus

Andreo F, Domínguez J, Ruiz J, et al. Impact of rapid urine antigen tests to determine the etiology of community-acquired pneumonia in adults. Respir Med 2006 ; 100 : 884–91.

Anjay MA, Anoop P. Diagnostic utility of rapid immunochromatographic urine antigen testing in suspected pneumococcal infections. Arch Dis Child 2008 ; 93 : 628–31.

Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med 2010 ; 363 : 1005–15.

Bourdon N, Bérenger R, Lepoultier R, et al. Rapid detection of vancomycin-resistant enterococci from rectal swabs by the Cepheid Xpert vanA/vanB assay. Diagn Microbiol Infect Dis 2010 ; 67 : 291–3.

Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) : data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile - infection (CDI). Clin Microbiol Infect 2009 ; 15 : 1053–66.

Dick MH, Guillerm M, Moussy F, et al. Review of two decades of cholera diagnostics--how far have we really come ? PLoS Negl Trop Dis 2012 ; 6 : e-1845.

Dominguez J. Detection of Streptococcus pneumoniae antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. Chest 2001 ; 119 : 243–9.

Eckert C, Lalande V, Barbut F. Diagnostic des infections à Clostridium difficile. Journal des Anti-infectieux 2011 ; 13(2) : 67–73.

EFSA. Scientific Opinion on VTEC – seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. The EFSA Journal 2013 ; 11 : 3138.

Farina C. Urinary detection of Streptococcus pneumoniae antigen for diagnosis of pneumonia. New Microbiol 2002 ; 25 : 259–63.

Ketter L, Cohen-Bacrie S, Prere MF. Évaluation de trois tests de diagnostic rapide de Campylobacter jejuni et coli à partir d'échantillons fécaux. Pathol Biol 2011 ; 1 : 16–8.

Pesola GR. The urinary antigen test for the diagnosis of pneumococcal pneumonia. Chest 2001 ; 119 : 9–11.

Recommendations for diagnosis of Shiga toxin producing Escherichia coli infections by clinical laboratories. MMMWR October 16, 2009 ; 58 : RR-12.

Saha SK, Darmstadt GL, Yamanaka N, et al. Rapid diagnosis of pneumococcal meningitis : implications for treatment and measuring disease burden. Pediatr Infect Dis 2005 ; 24 : 1093–8.

Tenover FC, Novak-Weekley S, Woods CW, et al. Impact of strain type on detection of toxigenic Clostridium difficile : comparison of molecular diagnostic and enzyme immune assay approaches. J Clin Microbiol 2010 ; 48 : 3719–24.

Verani JR. Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC. 2010.

Chapitre 6

Automatisation et systèmes d'information

C. Martin, H. Poupet, C. Poyart

PLAN DU CHAPITRE

Introduction

L'automatisation complète de la prise en charge des prélèvements de bactériologie constitue un véritable challenge actuellement en plein développement. Le laboratoire de bactériologie est un des derniers secteurs de la biologie où l'automatisation n'est que partielle. Les principales raisons à ce retard sont un volume d'analyses plus faible par rapport aux secteurs biochimique, hématologique et immunologique, la variété des échantillons à traiter (sang, tissus, sécrétions, liquides, matériels) qui nécessite une standardisation des étapes préanalytiques et la variété des techniques mises en œuvre (étude cytologique, mise en culture, identification, étude de la sensibilité aux antibiotiques, détection moléculaire) qui impliquent l'utilisation de nombreux automates ou modules qui doivent être reliés pour réaliser une véritable chaîne d'analyses.

Certains secteurs de l'analyse bactériologique ont été, depuis de nombreuses années, automatisés de façon plus ou moins complète comme la détection de la positivité des hémocultures, l'identification de l'espèce bactérienne et l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques [2, 7]. Certaines analyses comme l'examen cytobactériologique des urines (cytologie urinaire et détection de la bactériurie) ont bénéficié de l'apparition de nouvelles technologies permettant ainsi d'améliorer une automatisation [4, 11, 22]. Enfin, plus récemment, l'apparition d'automates d'ensemencement des échantillons et le développement de robot d'incubation, de lecture automatisée des milieux de culture, de sélection des colonies permettent d'envisager une chaîne d'analyse bactériologique complète [3, 23]. Les systèmes d'information doivent être en prise directe voire partie intégrante de ces futures chaînes. Des logiciels appelés *middlewares* (assurant la communication via un réseau d'échange d'informations entre les différentes applications) deviennent le lien crucial nécessaire pour assurer la cohérence des actions de chaque automate et pour adapter les flux de travail.

Les analyses sérologiques sont déjà automatisées et traitées avec les analyses de biochimie, d'immunologie, de pharmacologie fondées sur le principe de la réaction antigène-anticorps. Les analyses moléculaires sont également de plus en plus automatisées avec des automates d'extraction des acides nucléiques, d'amplification et de séquençage génomique. Comme pour la sérologie, les analyses de biologie moléculaire doivent faire, lorsque c'est possible, l'objet d'une approche syndromique ; c'est-à-dire considérer une symptomatologie clinique et en rechercher l'étiologie sans a priori (bactérie, parasite, champignon, virus) [10].

Rappels des étapes de l'analyse cytobactériologique et état actuel de l'automatisation

L'analyse bactériologique des prélèvements « nobles » (liquides de ponction, tissus, collections profondes) est associée à des étapes cytologiques qui complexifient le processus (association de coloration cytologique, comptage). Le déroulement de l'examen cytobactériologique se décompose en plusieurs étapes qui sont prises en compte dans le résultat final de l'analyse (Fig. 6.1 et Tableau 6.1).

Les étapes préanalytiques (prélèvements, enregistrement, tri des échantillons) sont longues et fastidieuses. La diversité des contenants a longtemps été un frein à l'automatisation de la phase d'ensemencement.

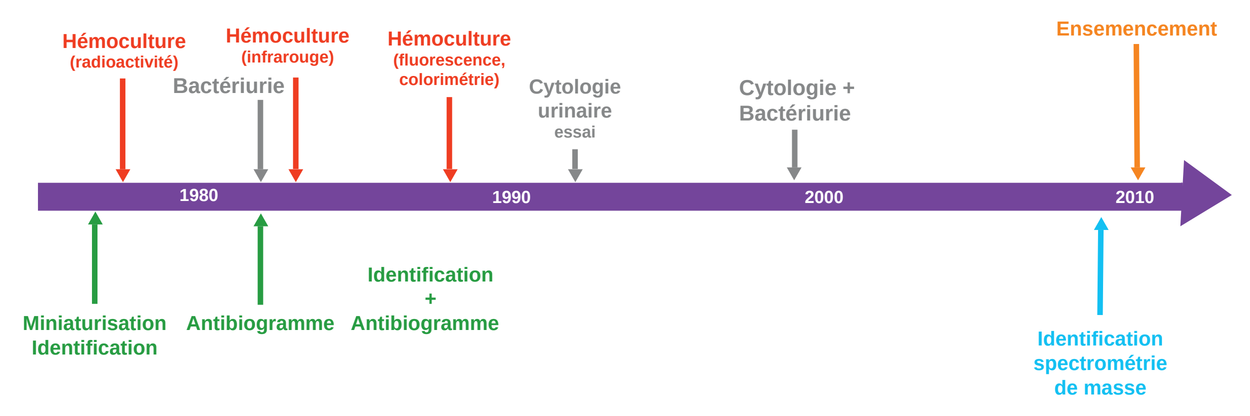


Fig. 6.1 **Étapes de l'automatisation en bactériologie depuis 1970.**

Tableau 6.1 État de l'automatisation des différentes étapes de l'analyse bactériologique.

Étapes	Automatisation	Manuelle
Enregistrement des prélèvements	+ (prescription connectée scanneurs)	+ (saisie clavier)
Tri des prélèvements	+ (si standardisation des contenants)	+
Cytologie quantitative	+ (urines, liquides ponction)	+ (urines, liquides ponction)
Confection du frottis	+	+
Coloration du frottis	+	+
Microscopie	–	+
Mise en culture	+	+
Incubation	+	+
Sélection des colonies *Picking*	+	+
Préparation de l'inoculum	–	+
Identification	+	–
Antibiogramme	+	+

Analyses microscopiques

Parallèlement à l'analyse bactériologique, une étude cytologique quantitative et qualitative est réalisée sur des prélèvements liquides normalement stériles (urines, liquides de ponction). L'étude cytologique est importante pour apprécier la réaction cellulaire. Cette analyse nécessite une observation au microscope et des hématimètres (Lemaur, Malassez, etc.). Cependant, l'hétérogénéité cytologique des liquides biologiques a retardé la mise au point de systèmes automatiques de lecture et de comptage. Les prélèvements d'urine ont été les premiers à bénéficier de l'automatisation en raison du nombre de prélèvements reçus au laboratoire (examen le plus fréquent) et du volume disponible d'échantillon (plusieurs millilitres).

Les automates de cytologie et de détection de la bactériurie commercialisés actuellement sont fondés sur l'analyse d'images (IQ Elite®, Iris Diagnostics; LabUMat Urised®, 77 Elektronika, I2A®) permettant la caractérisation et la numération des éléments figurés et des particules ou par détection laser par cytométrie de flux après marquage par des fluorochromes des cellules (UF 500i et 1000i®, Sysmex®, bioMérieux). Les études disponibles montrent de bonnes performances de l'automate en termes de sensibilité et de spécificité pour les leucocytes par rapport à la technique manuelle [1, 9]. La reprise de l'analyse ou le recours à la technique manuelle est alors nécessaire afin de contrôler les échantillons dont les paramètres sont en alarme ou lorsque les urines sont très troubles. Certains automates permettent l'étude cytobactériologique de liquides biologiques (liquide articulaire, pleural, d'ascite, dialyse péritonéale) après validation. Ces appareils sont actuellement implantés dans beaucoup de laboratoires et de plateaux techniques.

L'analyse cytologique qualitative nécessite pour certaines analyses une caractérisation précise des éléments cellulaires. Pour cela, il est nécessaire d'effectuer une coloration au MGG (May-Grünwald-Giemsa) à partir d'un frottis après cytocentrifugation de préférence (LCR, liquide articulaire, liquide d'ascite, etc.). Cette étape de coloration a été automatisée il y a quelques années, permettant ainsi sa standardisation en éliminant la variabilité liée à l'opérateur. Ces automates sont disponibles pour réaliser la quasi-totalité des colorations réalisées en bactériologie : Gram, MGG, auramine et Ziehl-Neelsen. Leur principe repose sur le passage dans des bains de colorants, sur le dépôt ou sur l'aérosolisation de ceux-ci. Les automates récents prennent mieux en compte l'aspect sécurité : enceinte étanche pour éviter la dispersion aérienne de produits toxiques, système de récupération des déchets et systèmes de fixation et de rinçage plus performants pour éviter les contaminations entre les échantillons. La traçabilité concernant les opérations de coloration, de gestion des dates de péremption des colorants est également une amélioration en termes de qualité d'analyse.

Mise en culture

L'étape de mise en culture est une étape essentielle qui nécessite une technique parfaitement standardisée et reproductible permettant de visualiser et d'isoler de façon la plus exhaustive possible les différentes bactéries présentes dans l'échantillon biologique, afin de permettre une identification et un antibiogramme. Si le nombre ou la taille des colonies

pour une même espèce bactérienne est suffisant, l'identification et l'antibiogramme pourront être réalisés directement ; en revanche, si le nombre est faible, un réisolement sera nécessaire.

La plupart des bactéries isolées en pratique médicale se développent sur des milieux de composition plus ou moins complexes. Les milieux utilisés sont soit des milieux d'isolement solide en boîte de Petri, soit des milieux d'enrichissement liquides qui permettent une croissance optimale même à partir de prélèvements paucibactériens. Des géloses sélectives peuvent être utilisées dans des situations particulières, notamment pour la recherche de certaines bactéries dans un prélèvement polybactérien (bactéries entéropathogènes dans les selles ou dépistage d'un portage de *S. aureus* par exemple). Des géloses sélectives, contenant un système d'identification chromogène fondé sur la mise en évidence d'une activité enzymatique propre à l'espèce recherchée, ont été mises au point à la fin des années 1980.

Avant la conception des chaînes automatisées complètes, l'ensemencement était la dernière grande étape de l'analyse bactériologique à automatiser. Différents automates d'ensemencement sont apparus sur le marché ces dernières années (Innova®, Becton Dickinson Diagnostics ; InnoqlA® FA/MI Becton Dickinson Kiestra ; WASP® Copan ; Previ Isola®, bioMérieux ; Prélude® I2A), et ont été installés dans un certain nombre de plateaux techniques [4, 22, 23].

Un des défis à résoudre est de pouvoir ensemencer des prélèvements variés liquides ou solides, reçus dans des récipients également variés nécessitant des cultures semi-quantitatives ou simplement qualitatives. Les automates d'ensemencement permettent d'éviter la répétition des tâches. Les prélèvements sont ensemencés par différents moyens (öse, peigne, bille magnétique) à partir d'une grande variété de récipients. Différents programmes, pour certains appareils (Innova®, Becton Dickinson Diagnostics ; InnoqlA® FA/MI Becton Dickinson Kiestra ; WASP® Copan ; Prélude® I2A), permettent de choisir le schéma d'isolement [3]. Les échantillons biologiques obtenus par écouvillonnage sont déchargés dans un milieu liquide avant ensemencement ou, mieux, sont prélevés directement en utilisant des systèmes comportant un écouvillon sécable et un milieu de transport liquide (ESwab®, Copan). Ces systèmes de prélèvements permettent un meilleur recueil des échantillons et une conservation possible [15, 22, 24]. Une des limites de ces systèmes est leur impossibilité de traiter des prélèvements de faible volume comme les LCR qui, dès lors, nécessitent une étape manuelle ou semi-manuelle, comme c'est le cas pour le système BD-Kiestra®. Certains échantillons solides (biopsie de tissus ou d'os par exemple), qui nécessitent un broyage préalable à l'aide de dispositifs spéciaux dans des conditions d'asepsie rigoureuse, imposent également une étape technique manuelle.

L'hémoculture est l'analyse la plus fréquente en milieu hospitalier après l'examen cytobactériologique des urines (ECBU). La détection de la positivité des flacons d'hémoculture a été une des premières étapes de l'automatisation des laboratoires de bactériologie. L'évolution s'est faite au cours des années vers des modules avec des étuves à agitation intégrées, une automatisation de la lecture (chariotage des flacons vers le module de lecture puis présence de détecteur de croissance dédié à chaque flacon) et l'élimination des flacons négatifs. L'utilisation d'algorithmes de détection a permis la détection d'hémocultures contenant des bactéries ne troublant pas les bouillons de cultures (*Campylobacter* sp. par exemple). L'amélioration des performances de la composition des milieux de culture et l'apport de systèmes de neutralisation des antibiotiques (résine, charbon) ont augmenté la sensibilité de la détection des hémocultures (y compris chez des patients traités par des antibiotiques) et ont ainsi permis de réduire les temps d'incubation à 5 jours. Le raccourcissement des délais de détection a permis de réduire le délai de rendu de l'examen microscopique des flacons positifs au clinicien, mais sans pour autant avoir un impact important sur le délai de rendu final (identification et antibiogramme) une fois le flacon détecté positif.

Identification bactérienne

L'identification bactérienne a longtemps reposé sur l'utilisation de galeries biochimiques associant de 20 à 40 caractères. Le choix de la galerie était fait après prise en considération des tests d'orientation comme l'aspect des colonies (pigmentation, hémolyse), les exigences culturales (milieu, atmosphère), la morphologie des bactéries après coloration de Gram et des tests rapides d'orientation sur colonies (oxydase, catalase, uréase, etc.). L'automatisation de l'identification n'a pu être réalisée qu'après une étape de miniaturisation initiée par la société API Systems au début des années 1970. Ensuite, l'automatisation de la lecture (colorimétrie ou fluorimétrique), puis la distribution de l'inoculum ont été intégrées. La préparation de l'inoculum demeure aujourd'hui encore une étape manuelle. L'automatisation simultanée de l'identification et de l'antibiogramme en milieu liquide (qui a précédé l'automatisation de la lecture des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé) a permis de les associer dans des galeries mixtes (Combo). Les automates disponibles actuellement sur le marché (Vitek®, bioMérieux ; Phoenix Becton®, Walkaway Siemens) permettent l'identification et l'antibiogramme avec des galeries ou des cartes, séparées ou combinées, en 4 à 18 heures suivant les espèces. Ces automates permettent l'identification des espèces majoritairement isolées en pratique médicale (entérobactéries, staphylocoques, streptocoques).

Grâce aux milieux chromogènes, l'isolement et l'identification sont simultanés et sont utilisés dans le diagnostic de bactéries uropathogènes, d'entérobactéries responsables de diarrhées ou dans le dépistage de *Staphylococcus aureus* ou de *Streptococcus agalactiae*. L'utilisation de ces milieux a permis de faciliter le traitement de certaines analyses qui peuvent représenter une part non négligeable de l'activité d'un laboratoire.

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, apparue plus récemment, est une technique rapide (quelques minutes) qui repose sur l'analyse du spectre des protéines totales ionisées et séparées après bombardement par un laser. Le spectre ou une partie du spectre (position et intensité) est comparé à ceux présents dans la base de données. Un score d'appariement ou de vraisemblance classe le spectre et précise l'identification bactérienne [8]. La sensibilité et la rapidité de cette technique ont été mises à profit

dans l'identification de la bactérie présente dans les flacons d'hémoculture détectés positifs [25], soit à partir du culot de centrifugation d'une aliquote du flacon [14], soit à partir d'une subculture sur milieu solide du flacon incubée 4 à 6 heures [18].

Étude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques s'effectue en milieu gélosé ou en milieu liquide. La méthode en milieu liquide a été rapidement automatisée (turbidimétrie). Elle repose sur la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) vraie sur une large gamme de concentrations de l'antibiotique ou la détermination d'une CMI calculée à partir d'une gamme restreinte. Les automates présentent des systèmes experts qui permettent la détection de mécanismes de résistance ou de phénotypes impossibles après confrontation avec l'identification. L'harmonisation des recommandations nationales avec les recommandations européennes va permettre une mise à jour plus rapide des systèmes experts des antibiogrammes en milieu liquide. Les inconvénients de ces systèmes automatisés sont liés : (1) à l'utilisation de milieux liquides qui empêche les contrôles de pureté, (2) au caractère fermé des automates et donc à la nécessité d'utiliser des réactifs spécifiques de l'automate et de ne pas pouvoir choisir les molécules antibiotiques à tester, et (3) à la difficulté de modifier les systèmes experts (mise à jour des recommandations). Le principal avantage est de permettre le traitement rapide du flux important des analyses concernant des bactéries à croissance rapide et présentant des profils de résistance connus, et de disposer d'un système expert, utile pour des laboratoires polyvalents à l'interprétation de l'antibiogramme [6, 26].

La lecture des antibiogrammes en milieu gélosé a bénéficié d'une automatisation plus récente nécessitant la saisie de l'identification ou la liaison avec un automate d'identification. Cependant, l'adjonction d'un incubateur et une lecture automatisée des boîtes dont la croissance est détectée suffisante ont permis une ergonomie plus importante tout en gardant l'avantage d'une plus grande souplesse dans le choix des antibiotiques et des fournisseurs de réactifs [12]. L'utilisation de la spectrométrie de masse pour détecter des résistances aux antibiotiques est en cours de développement mais n'a pas d'application large en routine [19].

L'association des automates d'identification et d'antibiogramme nécessite des liaisons et des logiciels informatiques (*middlewares*) pour l'expertise des résultats mais aussi pour l'exigence de la traçabilité.

L'automatisation de la détection des mycobactéries (hémocultures et autres prélèvements) et leur étude de la sensibilité aux antibiotiques ont suivi la même évolution tout en s'adaptant à la spécificité physiologique (délai de culture, milieu de culture, antituberculeux) de ce genre bactérien.

Les raisons d'automatiser la bactériologie

Les raisons d'automatiser le secteur de bactériologie sont les mêmes que celles qui ont prévalu dans les autres disciplines de la biologie médicale.

L'automatisation vue sous un aspect quantitatif permet d'augmenter l'efficience, c'est-à-dire la performance, la productivité, tout en maîtrisant les dépenses de personnel (compensation du manque croissant de personnel) et de réactifs, en évitant les équipements redondants et en permettant un rendu de résultat plus court [21].

La standardisation (meilleure reproductibilité) et l'accréditation (norme ISO 15189) sont les éléments qualitatifs importants. L'automatisation de certaines tâches répétitives permet une meilleure reproductibilité, une moindre variabilité des résultats (ensemencement des prélèvements). Les premières étapes (ensemencement, mise en incubation, tri des cultures négatives), qui constituent des tâches répétitives peu valorisantes, chronophages mais conditionnant les étapes suivantes (obtention de colonies isolées, sélection des colonies afin de réaliser identification et antibiogramme), ont été intégrées dans les chaînes robotisées. Cela permet le redéploiement du personnel pour le développement d'activités nouvelles et innovantes.

Les réponses aux exigences de la norme ISO 15189 en termes de traçabilité de l'ensemble des étapes techniques sont plus facilement obtenues. Ces nouvelles contraintes réglementaires ont également participé à l'accélération des restructurations avec la mutualisation des moyens pour la biologie de routine (plateaux techniques) tout en maintenant une biologie de proximité (centre de prélèvements).

La plupart des urgences de microbiologie sont des urgences de prélèvements, un traitement antibiotique probabiliste étant instauré le plus souvent sans attendre, après le prélèvement. Le traitement au laboratoire des échantillons peut, pour certains, être différé grâce à l'usage de milieux de transport. En effet, les situations d'urgence diagnostiquées en infectiologie sont limitées : paludisme, méningite où l'examen microscopique en urgence est nécessaire, la sérologie VIH lors d'accident d'exposition au sang et les sérologies réglementaires pour la qualification des prélèvements des donneurs d'organes. Les autres situations sont celles réalisées après accord du médecin prescripteur (antigène soluble urinaire légionelle, ECBU chez la femme enceinte et l'enfant si suspicion de pyélonéphrite, liquide de dialyse péritonéale et les sérologies hépatites) [27]. Dans ces situations d'urgence (hors sérologie), seuls les ECBU sont concernés par l'automatisation de l'ensemencement ; les LCR et les liquides de ponction bénéficient d'un ensemencement manuel ou semi-automatique pour certaines chaînes.

L'automatisation complète permet de rationaliser le flux de certaines étapes de l'analyse bactériologique, notamment celle d'ensemencement, chronophage, et d'augmenter la qualité des examens tout en facilitant la traçabilité. Pour les prélèvements polybactériens, la traçabilité concernant l'identification et l'antibiogramme de chaque isolat est primordiale pour un rendu fiable des résultats.

La diminution du délai de rendu des résultats issus des techniques bactériologiques standard apparaît plus limitée que celle obtenue pour d'autres disciplines (hématologie, biochimie) en raison de paramètres critiques (délai minimal de croissance incompressible par exemple), même si les automates d'antibiogramme et surtout d'identification ont déjà permis des gains de temps appréciables. La nécessité de disposer rapidement d'une identification et de la sensibilité aux antibiotiques ont un impact sur l'adaptation de l'antibiothérapie [17].

Afin d'augmenter la sensibilité et la rapidité d'obtention des résultats des antibiogrammes, des essais de miniaturisation de tests sont encore au stade de recherche ou en développement (pour plus de détails voir revue in [29]), mais ces nouveaux outils seront incorporés dans les chaînes robotisées du futur et réduiront le délai du rendu des résultats.

Structures et fonctionnalités des chaînes de bactériologie

Les chaînes sont constituées de différents modules qui peuvent être acquis en fonction du type et du volume d'activité du laboratoire. Le choix de ce type d'investissement est important financièrement et doit être évalué avant réalisation [20].

La robotisation de l'ensemencement et de la réalisation de frottis à partir des produits pathologiques ouvre la perspective de réaliser une automatisation quasi complète d'une grande majorité des étapes de l'analyse bactériologique. L'incubation avec des étuves équipées de détecteurs de croissance (caméra digitale) permet la sélection des colonies qui sont ensuite prélevées (*picking*) [16] afin de poursuivre l'analyse (microscopie après coloration, identification par spectrométrie de masse [23] et étude de la sensibilité aux antibiotiques [3]).

L'importance du logiciel *middleware* doit être soulignée. Il permet à plusieurs processus qui tournent sur une ou plusieurs machines d'interagir à travers le réseau. Celui-ci va donc faire le lien entre tous les automates composant la chaîne. Son rôle sera étendu à des tâches dévolues jusqu'alors au système de gestion du laboratoire. Les *middleware* assureront la traçabilité de l'ensemble des actions automatisées, concentreront les activités manuelles (sélection et *picking* des colonies) et devront intégrer un module de validation. La surveillance épidémiologique pourra être réalisée à partir de modules intégrés. L'aspect ergonomique et fonctionnel de l'interface avec les techniciens et les biologistes (validation) est impératif et devrait confiner les systèmes de gestion des laboratoires (SGL) actuels au rôle d'interface avec le système de gestion des patients et de la facturation. Les modules de microbiologie des SGL commercialisés actuellement sont, dans leur quasi-totalité, peu adaptés à la gestion des analyses bactériologiques et le transfert de la prise en charge du volet informatique par les fabricants de chaînes (sous réserve d'investissement très important) permettrait une utilisation optimisée à l'aide d'un seul logiciel.

L'aspect post-analytique (rendu des résultats, etc.) doit être également pris en compte. Le rendu des résultats au clinicien et au patient doit utiliser les moyens de communication modernes et sécurisés déjà utilisés.

Les freins à l'automatisation en bactériologie

Paramètres inhérents à la discipline

La bactériologie standard repose principalement sur un examen cytobactériologique d'échantillons cliniques d'origine et de nature diverses avec mise en culture. L'analyse bactériologique est une succession d'étapes techniques nécessitant une expertise. Chaque étape peut être automatisée à des degrés divers, mais automatiser l'ensemble nécessite de relier et coordonner ces différentes étapes (isolement, incubation, sélection, identification, antibiogramme). Les logiciels *middleware* jouent et joueront un rôle crucial dans l'automatisation de la « chaîne » microbiologique.

Le fait de s'intéresser à des organismes vivants capables d'évoluer entraîne des modifications permanentes de la classification (identification) et des mécanismes de résistance (antibiogramme), qui sont à prendre en compte.

L'automatisation de l'activité de bactériologie est fonction du type de laboratoire. Les automates doivent être modulables en fonction de l'activité de celui-ci (nombre et types d'analyses).

La diversité de la nature des échantillons est une des principales difficultés pour automatiser l'étape initiale d'ensemencement. La standardisation des récipients de recueil du prélèvement est un préalable obligatoire qui est déjà pris en compte par les fabricants d'automates. L'ensemencement des échantillons liquides est facile si la quantité est suffisante. Ainsi, un laboratoire traitant une majorité d'urines peut automatiser ce poste avec un gain de productivité évident. En revanche, le processus d'automatisation se complexifiera avec la diversité des prélèvements reçus et nécessitera l'utilisation de systèmes standardisés de recueil du prélèvement.

La durée de l'analyse bactériologique est également un facteur de complexification de l'automatisation ; certains résultats sont disponibles rapidement (cytologie, microscopie après coloration), d'autres tardivement (jusqu'à 3 mois), même si une majorité de résultats est rendue dans un délai de 2 à 5 jours.

L'expertise humaine demeure nécessaire pour la sélection des colonies à identifier dans des prélèvements polybactériens. Cette étape à court terme ne peut pas être entièrement automatisée et nécessite donc un apprentissage de l'opérateur à la lecture des images pour sélectionner les différents morphotypes.

L'aspect sécurité au niveau ensemencement (aérosolisation) et au niveau identification (inoculum important) a aussi dû être pris en compte avant robotisation de ces étapes, même si les prélèvements ciblés en vue de la recherche de pathogènes de classe 3 (bacille tuberculeux, etc.) ne sont pas inclus dans la filière automatisée.

Aspect traditionnel de la discipline

Un certain nombre de bactériologistes restent attachés par leur formation aux méthodes manuelles de diagnostic. Cependant, l'apport de l'automatisation des autres disciplines de la biologie médicale et la réunion de toutes les disciplines sur des plateaux automatisés ont permis une accélération de celle-ci et une évolution des mentalités.

Solutions automatisées disponibles à ce jour

Les éléments développés récemment pour une automatisation complète du laboratoire de bactériologie sont des automates d'ensemencement, des étuves permettant la détection

des géloses à cultures positives et des systèmes d'imagerie permettant la visualisation des boîtes et la sélection des colonies. Les autres éléments de la chaîne sont le spectromètre de masse et les automates d'antibiogramme. Aujourd'hui, quatre solutions – Wasp® (Copan), WCA Kiestra® (Becton Dickinson), PREVI Isola® (bioMérieux) et PreLud® (I2A) – possèdent un ensemenceur. La standardisation des moyens de prélever et de leur contenant a permis de limiter l'étape de tri des échantillons; l'identification par code à barre de celui-ci et des consommables utilisés au décours des autres étapes de l'analyse (boîte de Petri, tube de dilution, etc.) a permis la traçabilité de l'ensemble du processus analytique. La solution BD-Kiestra® est actuellement la plus aboutie en termes d'automatisation notamment, avec une liaison entre les modules d'ensemencement et d'incubation. L'avantage principal du module d'ensemencement réside dans la standardisation, et la qualité des isolements polybactériens (exhaustivité et recueil des différents morphotypes) [11]; le gain de temps direct est marginal pour cette étape mais des gains induits en évitant des ré-isolements sont certains [28]. En revanche, l'utilisation d'un système d'imagerie réalise une détection précoce des colonies et, couplé à un spectromètre de masse, ce système permettrait un gain de temps important [23].

Conséquences de l'automatisation

L'automatisation permettra une traçabilité, une standardisation et une productivité supérieures aux méthodes de routine actuelles. Néanmoins, cette automatisation a aussi des conséquences à ne pas négliger pour la vie d'un laboratoire, notamment en termes de compétence :

- la polyvalence du personnel technique va être de plus en difficile à maintenir;
- les techniciens devront être formés à l'utilisation et la maintenance quotidienne de ces robots;
- l'importance de l'informatique dans la gestion des automates va nécessiter des personnels compétents et dédiés à cet aspect.

Cependant, à côté de ces compétences nouvelles, les compétences techniques et biologiques « traditionnelles » devront être maintenues pour traiter les prélèvements précieux non pris en charge par les automates (LCR, os, etc.), mais aussi pour les étapes importantes (interprétation de la microscopie, sélection des colonies) afin d'assurer une interprétation médicale pertinente du rendu des automates. Enfin, il sera nécessaire de garder une certaine polyvalence du personnel pour pouvoir assurer la continuité de l'activité et donc des soins en cas de pannes d'automates.

Cette complexité pose plusieurs questions :

- Quelles solutions en cas de panne : technique manuelle à chaque étape de l'analyse avec les contraintes liées à la validation de méthodes de ces dernières, ou utilisation de deux chaînes robotisées identiques mais nécessitant un investissement conséquent?
- Comment maintenir les compétences des techniciens pour les solutions de *back-up* manuelles?

Le choix de la configuration d'un laboratoire donné dépend de la prise en compte de paramètres déjà évoqués (nombres, types, flux et diversité des prélèvements), mais aussi de la topologie du laboratoire et du potentiel du fabricant à proposer une offre qui pourra intégrer des modules avec des fonctionnalités répondant à des besoins futurs. Une étude in situ de ces paramètres et des visites sur des sites comparables en termes d'activité et d'architecture [6] d'organisation sont nécessaires [13].

Conclusion

Le diagnostic bactériologie repose sur différentes étapes. Face au développement de techniques rapides (*doctor tests*, méthodes moléculaires), les méthodes classiques (culture, identification, étude de la sensibilité aux antibiotiques) gardent toute leur place. L'automatisation des laboratoires de bactériologie en plein essor a été permise par la miniaturisation, le développement ou l'adaptation de nouvelles technologies aux contraintes de l'étude de micro-organismes. Cette automatisation des étapes microbiologiques et plus particulièrement de l'ensemencement montre que la culture demeure une étape essentielle qui ne peut pas être remplacée; c'est un préalable à l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. L'automatisation de la presque-totalité des étapes de l'analyse bactériologique standard entraîne une évolution des métiers de techniciens et de biologistes [28]. Cependant, l'expertise humaine demeure nécessaire lors de l'étape préanalytique (adéquation prescription–prélèvement) et lors de l'étape analytique (sélection des colonies dont l'analyse est pertinente et devant être poursuivie afin d'éviter la production de résultats inutiles coûteux sans valeur ajoutée pour le clinicien et par conséquent pour le patient). Cette automatisation de la bactériologie doit s'inscrire dans le cadre plus large de la microbiologie pour une meilleure prise en charge du patient [10]. L'utilité de ces nouvelles technologies est parfois controversée [20] et elles ne sont pas toujours intégrées au parcours de soins du patient [5].

Références

[1] Akin OK, Serdar MA, Cizmeci Z, et al. Comparison of LabUMat-with-UriSed and iQ200 fully automatic urine sediment analysers with manual urine analysis. Biotechnol Appl Biochem 2009; 53 : 139–44.

[2] Bernier M, Catelain F, Phillipon A. Place des nouveaux automates dans un laboratoire de bactériologie. Rev Fr Lab 2001; 335 : 49–56.

[3] Bourbeau PP, Ledeboer NA. Automation in clinical microbiology. J Clin Microbiol 2013; 51 : 1658–65.

[4] Bourbeau PP, Swartz BL. First evaluation of the WASP, a new automated microbiology plating instrument. J Clin Microbiol 2009; 47 : 1101–6.

[5] Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, et al. Better test, better care : improved diagnostics for infections diseases. Clin Infect Dis 2013; 57 : S139–70.

[6] Courvalin P. Perspective. In : Courvalin P, Flandrois JP, Goldstein F, et al., editors. L'antibiogramme automatisé. Paris : Vigot; 1988. p. 131–5.

[7] Croize J, Reculé C, Pelloux I, et al. L'automatisation en bactériologie : un challenge continu. L'expérience du centre hospitalier universitaire de Grenoble. Spectra Biologie 2007; 160 : 45–51.

[8] Degand N, Ruimy R. Intérêts et limites actuelles du MALDI-TOF en microbiologie. J Anti-Infectieux 2013; 14 : 159–67.

[9] Fabbro C, Darolles J, Rault JP. Evaluation of the performances of the UF-1000i® automated urine analyzer. Ann Biol Clin 2011; 69 : 431–9.

[10] Fournier PE, Drancourt M, Colson P, et al. Modern clinical microbiology : new challenges and solutions. Nat Rev Microbiol 2013; 11 : 574–85.

[11] Froment P, Marchandin H, Van de Perre P, et al. Automated versus manual sample inoculations in routine clinical microbiology : a performance evaluation of the fully automated InoqulA instrument. J Clin Microbiol 2014 ; 52 : 796–802.
[12] Goldstein F, Nguyen Van JCA. L'antibiogramme automatisé : des progrès mais pas de miracles ! Biotribune 2006 ; 19 : 13–6.
[13] Greub G, Prod'hom G. Automation in clinical bacteriology : what system to choose ? Clin Microbiol Infect 2011 ; 17 : 655–60.
[14] Haigh JD, Green IM, Ball D, et al. Rapid identification of bacteria from bioMérieux BacT/ALERT blood culture bottles by MALDI-TOF MS. Br J Biomed Sci 2013 ; 70 : 149–55.
[15] Jones G, Matthews R, Cunningham R, et al. Comparison of automated processing of flocked swabs with manual processing of fiber swabs for detection of nasal carriage of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 2011 ; 49 : 2717–8.
[16] Jones P, Watson A, Davies M, et al. Integration of image analysis and robotics into a fully automated colony picking and plate handling system. Nucleic Acids Res 1992 ; 20 : 4599–606.
[17] Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T, et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. J Antimicrob Chemother 2008 ; 61 : 428–35.
[18] Konnerth S, Rademacher G, Suerbaum S, et al. Identification of pathogens from blood culture bottles in spiked and clinical samples using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass-spectrometry analysis. BMC Res Notes 2014 ; 7 : 405.
[19] Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, et al. MALDI-TOF MS : an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. Proteomics Clin Appl 2013 ; 7 : 767–78.
[20] Ledeboer NA, Dallas SD. Point-Counterpoint : The automated clinical microbiology laboratory : fact or fantasy ? J Clin Microbiol 2014 ; 19 [Epub ahead of print].
[21] Matthews S, Deutekom J. The future of the diagnostic bacteriology. Clin Microbiol Infect 2011 ; 17 : 651–4.
[22] Mischnik A, Mieth M, Busch CJ, et al. First evaluation of automated specimen inoculation for wound swab samples by use of the Previ Isola system compared to manual inoculation in a routine laboratory : finding a cost-effective and accurate approach. J Clin Microbiol 2012 ; 50 : 2732–6.
[23] Mutters NT, Hodiamont CJ, de Jong MD, et al. Performance of Kiestra total laboratory automation combined with MS in clinical microbiology practice. Ann Lab Med 2014 ; 34 : 111–7.
[24] Novak SM, Marlowe EM. Automation in the clinical microbiology laboratory. Clin Lab Med 2013 ; 33 : 567–88.
[25] Pence MA, McElvania TeKippe E, Burnham CA. Diagnostic assays for identification of microorganisms and antimicrobial resistance determinants directly from positive blood culture broth. Clin Lab Med 2013 ; 33 : 651–84.
[26] Richter SS, Ferraro MJ. Susceptibility testing instrumentation and computerized expert systems for data analysis and interpretation. In : Murray PR, Jo Baron H, Jorgensen JH, et al., editors. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC : ASM Press ; 2009. p. 245–56.
[27] Société Française de Microbiologie. Continuité des soins en microbiologie. In : REMIC : Société Française de Microbiologie. 2010. p. 47–53.
[28] Talec R. L'automatisation en bactériologie, nouvelle priorité des laboratoires ? IRBM News 2010 ; 31 : 15–20.
[29] van Belkum A, Durand G, Peyret M, et al. Rapid clinical bacteriology and its future impact. Ann Lab Med 2013 ; 335 : 14–27.

Internet et bactériologie médicale

A. Philippon

PLAN DU CHAPITRE

Introduction

En un peu moins de 15 ans, Internet est devenu incontournable aussi bien dans la vie personnelle que professionnelle. L'importance d'Internet et des technologies qui y sont associées est attestée en France par l'existence d'une ministre déléguée aux petites et moyennes entreprises (PME), à l'Innovation et à l'Économie numérique, ayant rappelé en 2010 que : « les TICE ou technologies de l'information et de la communication généraient 25 % de la croissance mondiale et 40 % des gains de productivité en Europe ».

Au XXIe siècle, il est devenu possible d'écrire ou d'envoyer des images en temps réel à des collègues n'importe où sur la planète. L'e-learning ou la formation à distance, l'e-éducation, l'e-santé en sont encore à leurs balbutiements, en particulier en France. L'éducation et la médecine vont ainsi être profondément transformées au cours de la décennie prochaine. On retiendra surtout l'accès facile et rapide, souvent en moins d'une seconde, à une source phénoménale d'informations avec plus de 1000 milliards de sites en ligne dont, le plus souvent, l'accès est gratuit !

Historique

Peut-on même évoquer le terme d'historique quand le développement a été si rapide, comme en témoignent quelques dates récentes ?

En 1975, Bill Gates fonde Microsoft avec Paul Allen et invente un langage de programmation. En 1976, Steve Jobs et Serge Wozniak commercialisent Apple I dont 200 exemplaires sont vendus au prix de 666,6 dollars, mais 400 000 dollars en 2010 (du moins un exemplaire à l'occasion d'une vente aux enchères). Il est vrai qu'un an plus tard, Apple II est commercialisé et vendu à plus d'un million d'exemplaires en 6 ans. Le traitement de texte WordPerfect est inventé par Alan Ashton en 1979. En 1980, 2000 foyers sont raccordés au Minitel en France. Le premier PC sous MS-DOS de Microsoft est proposé en 1981. Le terme d'Internet est officialisé en 1983, alors qu'Arpanet, réseau interuniversitaire, existait depuis 1972. C'est aussi l'année des premiers virus informatiques. L'année 1984 est celle du Macintosh et de la première imprimante laser, alors que 1985 est celle de la première commercialisation de Windows (Microsoft). Un chercheur du CERN, Tim Bernes-Lee, invente un système reliant les pages présentes ou URL sur Internet, le *world wide web* ou www. Le premier appareil photographique numérique est commercialisé en 1990 par Dycam (États-Unis) et Logitech (Suisse). Le premier site Internet est créé au CERN en 1991. Le premier navigateur grand public (Netscape) ou *browser* est disponible en 1993. Yahoo ! apparaît en 1994, année des 25 millions d'internautes. Les premiers caméscopes digitaux apparaissent en 1995. Google est créé en 1998 et la connexion Wi-Fi tel Airport en 1999. L'année 2002 voit le lancement de la clé USB alors que Skype apparaît en 2004 en Estonie. Si le premier smartphone, le Black-Berry, est proposé en 2002, l'iPhone d'Apple apparaît en 2007. L'année 2010 est celle de la tablette avec iPad, toujours d'Apple, alors que les premiers concurrents émergent.

Nous étions de l'ordre de 20 millions d'internautes en 1995 ; nous voilà plus de 3 milliards en 2016. Jamais une invention ne s'est imposée aussi rapidement. Cependant, la fracture numérique persiste malgré l'apparition d'ordinateurs à petits prix (300 euros) dès 2007. En France, le taux de pénétration d'Internet est de l'ordre de 83 % des foyers, nous classant au 15e rang mondial.

Curieusement, un tel succès n'avait guère été anticipé si l'on en juge par l'opinion du président-directeur général de Digital Equipment Corp ayant dit en 1977 : « Il n'y a aucune raison pour que les gens veuillent d'un ordinateur chez eux ».

De même, la prévision de la compagnie américaine RCA en 1966 d'un parc prévisible de 220 000 ordinateurs dans le monde apparaît singulièrement sous-évaluée ; car il s'en vend en moyenne 300 millions par an de nos jours.

Quels sont les apports d'Internet pour un bactériologiste ?

Au plan bactériologique et à titre d'exemple, quelles sont les questions que l'on peut se poser et qui vont être explorées au minimum en moins d'un dixième de seconde ? Pourquoi accumuler revues, livres, ou documents imprimés ? Un simple ordinateur portable (1 à 3 kg) connecté en Wi-Fi (sans fil) va aisément remplacer n'importe quelle bibliothèque, d'autant qu'on peut s'y connecter à n'importe quelle heure du jour et de la nuit.

La liste de questions ci-dessous illustrera nos éventuels besoins satisfaits grâce à Internet dans les divers domaines relevant de notre spécialité :

- Quid des épidémies dans le Nord de la France à *Clostridium difficile* ?
- Dois-je écrire sur ma feuille de résultats *Chryseobacterium meningosepticum* ou *Elizabethkingia meningoseptica* ?
- Y a-t-il des infections humaines à *S. aureus* ST398 en France ?
- Quel est l'ordre (priorisation) des zoonoses non alimentaires en France ?
- Puis-je disposer de la feuille de déclaration pour un cas de brucellose, maladie à déclaration obligatoire (MDO) ?
- Comment détecter en pratique la résistance des streptocoques par efflux ?
- Quelle est la sensibilité normale d'*Escherichia coli* à l'ertapénème ?
- Quelle est la prévalence d'*E. coli* intermédiaire ou résistant à la ciprofloxacine soit en France, soit en Allemagne ?
- Quelle est la relation entre VEB-1 et infection nosocomiale ?
- Quelles mesures prendre pour l'éradication d'une souche d'entérocoque résistante aux glycopeptides ?
- Quid du « superbug » NDM-1 en France et des précautions à prendre ?
- Où commander des souches de contrôle de qualité ou encore des amorces pour une PCR ?
- Les résultats du dernier Contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale en bactériologie sont-ils en ligne ?
- Puis-je consulter le dernier rapport d'activité d'un Centre national de référence (CNR) ?
- Les résultats de l'indicateur ICALIN sur les infections nosocomiales sont-ils publiés ?
- Puis-je trouver une vidéoconférence sur la spectrométrie de masse ou MALDI-TOF ?
- Puis-je écouter et/ou voir (visioconférence asynchrone) les cours du Collège de France ?
- Au lieu d'aller à Abidjan pour une mission d'enseignement, puis-je faire les cours de Limoges et répondre aux questions posées par les étudiants ivoiriens (visioconférence synchrone) ?
- Je dois parler de *Bacillus anthracis* aux infirmières de l'hôpital. Puis-je trouver des images de cette bactérie dans une hémoculture, rare en France, du moins lors d'infection chez l'homme ?
- Disposant d'une séquence déoxyribonucléotidique, d'ailleurs envoyée par l'entreprise de séquençage par Internet (courriel), puis-je rapidement (en quelques minutes) préciser les gènes, voire encore les promoteurs probables ?

Un domaine récent s'est considérablement développé en quelques années, il s'agit de la bio-informatique.

En réalité, grâce à Internet et aux technologies actuelles de l'information, je puis répondre en quelques minutes à toutes ces questions si différentes dont certaines très pertinentes qui peuvent être posées par le chirurgien, le réanimateur, l'infirmière du service d'hygiène, voire les malades dans ces nombreux domaines relevant de notre spécialité. Enfin, certaines recherches sont impossibles (*Big Data*) sans Internet, en particulier pour l'analyse de dizaines, voire de centaines de séquences peptidiques ou nucléotidiques.

Carnet d'adresses

Lors des débuts d'Internet, dans les années 1995, il convenait de noter scrupuleusement les adresses URL (*uniform resource locator*) de quelques sites importants, par exemple ceux de recherche bibliographique (PubMed ou www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) ou encore ceux permettant la comparaison de séquences désoxyribonucléotidiques (NCBI, EMBL, ou encore DDBJ ou www.ddbj.nig.ac.jp/searches-e.html).

Depuis ces balbutiements, le carnet s'est bien rempli : plus de 1000 milliards de sites sont accessibles ; aussi, l'existence de moteurs de recherche a considérablement simplifié notre tâche. Cependant, certains sites ou certaines adresses URL peuvent être consultés quotidiennement, il est vrai dans notre vie personnelle, avec la lecture de certains journaux, l'écoute de radios, la consultation du bulletin météorologique, du compte bancaire ou encore la commande à passer de produits alimentaires. Par ailleurs, il existe plus de 1000 sites publics en France.

Les exemples ci-dessous vont illustrer cette nécessité d'archiver certaines adresses URL, donc de se créer un carnet d'adresses.

- Compte tenu des remaniements taxonomiques possibles, je désire connaître la dernière dénomination de *Chryseobacterium meningosepticum*, bactérie d'isolement peu fréquent, avant de finaliser la réponse pour le clinicien. Il est très simple d'aller sur un site de taxonomie, tels celui du National Center for Biotechnology Information (NCBI) ou celui du German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ). Le site américain NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) offre diverses fonctions que vous sélectionnez en haut et au milieu de la page en cliquant sur All Databases, par exemple PubMed (recherche bibliographique), Nucleotide ou Protein (banque de données de gènes) ou Taxonomy (base de données des appellations). La bonne réponse est donc *Elizabethkingia meningoseptica.* Comme les remaniements taxonomiques sont constants et nombreux, il est capital de ne pas perdre la face !
- Il est assez fréquent, lors de la validation d'un antibiogramme, de se poser la question de la sensibilité normale d'une espèce bactérienne pour un antibiotique, d'autant que certains peuvent être récents. Le site suivant est très

important. Il s'agit de celui de l'EUCAST, ou European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, qui harmonise les concentrations critiques en Europe. De plus, il met à disposition des biologistes des banques de données relatives à la distribution (CMI, diamètres) de populations bactériennes par espèce et par antibiotique (www.eucast.org/). La figure 7.1 illustre la distribution des CMI (mg/l) de l'ertapénème pour quatre espèces bactériennes avec la définition de la concentration épidémiologique (CE) ou *cut off* pour un échantillon de plusieurs centaines de souches.

- Le troisième exemple est celui d'un site lyonnais de grand secours, intitulé BIBI pour Bio Informatic Bacterial Identification. Ce site assez unique va vous permettre d'établir un diagnostic bactériologique fondé sur l'analyse rapide, en moins de 2 minutes, des homologies de séquence désoxyribonucléotidique d'un gène utilisé pour une identification, comme celui codant pour l'ARNr16S. Il s'agit donc d'un diagnostic moléculaire rapide à obtenir par rapport à diverses banques comme celle de souches de référence (Figure 7.2). Diverses expressions graphiques tel un dendogramme sont aisément extractibles et joignables à la feuille de rendu de résultats (http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi). Par ailleurs, lors de la consultation du site, il est possible d'activer, par simple clic sur le nom de la bactérie, l'accès aux données taxonomiques ou encore en cliquant sur le numéro d'enregistrement de la séquence aux diverses données du dépôt de la séquence sur Genbank.

Voulez-vous lire le premier article sur BIBI paru dans une revue américaine bien connue ? Aller à nouveau sur le site NCBI, évoqué au premier exemple, en sélectionnant All Databases ou encore PubMed. Si vous tapez : « Bibi Lyon », vous accédez à l'article de nos collègues lyonnais qui est exportable en un document pdf. Que signifie d'ailleurs « pdf » ? Le *portable document format* est un langage de description de pages d'impression créé par Adobe Systems.

Cet exemple de recherche rapide d'une publication et de sa lecture illustre la gratuité actuelle de très nombreuses publications, mais 6 mois après leur parution comme celles de l'American Society of Microbiology (ASM ; www.asm.org, sélectionner en haut à gauche).

Parmi les autres sites utiles à connaître, ne pas ignorer celui du ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé (www.sante.gouv.fr), ou encore celui de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé avec la réactovigilance (http://ansm.sante.fr).

Si la mémorisation d'adresses URL, appelées encore liens, signets, marque-pages, etc., est, voire était utile et nécessaire, en pratique de laboratoire, les moteurs de recherche actuels sont tellement performants et rapides qu'il conviendra seulement de taper sur le clavier le nom du site pour le retrouver en moins d'un dixième de seconde ou deux à trois mots clés pour accéder au bon site. Par ailleurs, les moteurs actuels vous permettent aisément de sélectionner tout le web ou seulement en français. Parmi les autres choix, plus récents, il est vrai, vous pourriez rechercher des images, des vidéos, des vues de la terre, des actualités, des forums, etc.

Moteurs de recherche

Actuellement, l'approche habituelle pour une recherche consiste, à l'aide d'un ou de plusieurs mots clés, à utiliser un moteur de recherche, application permettant de retrouver des ressources telles que pages web ou URL, vidéos, images, fichiers, forums Usenet, etc.

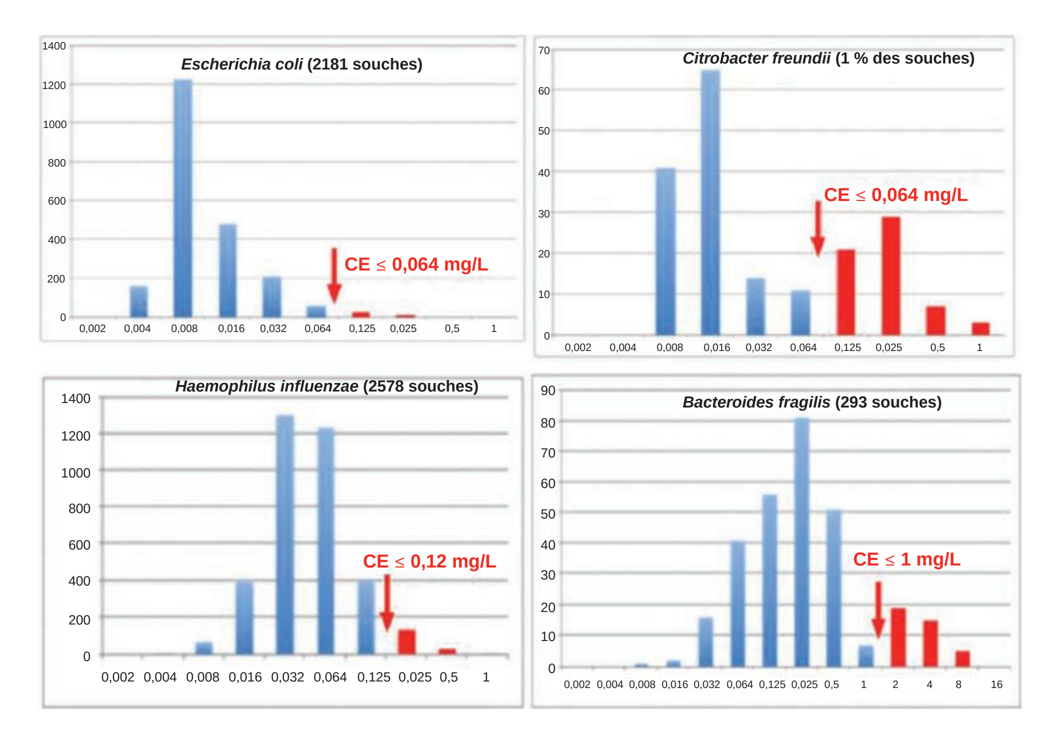


Fig. 7.1 Site EUCAST : distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) (mg/l) de l'ertapénème vis-à-vis de quatre espèces bactériennes, avec la détermination de la concentration épidémiologique (CE).

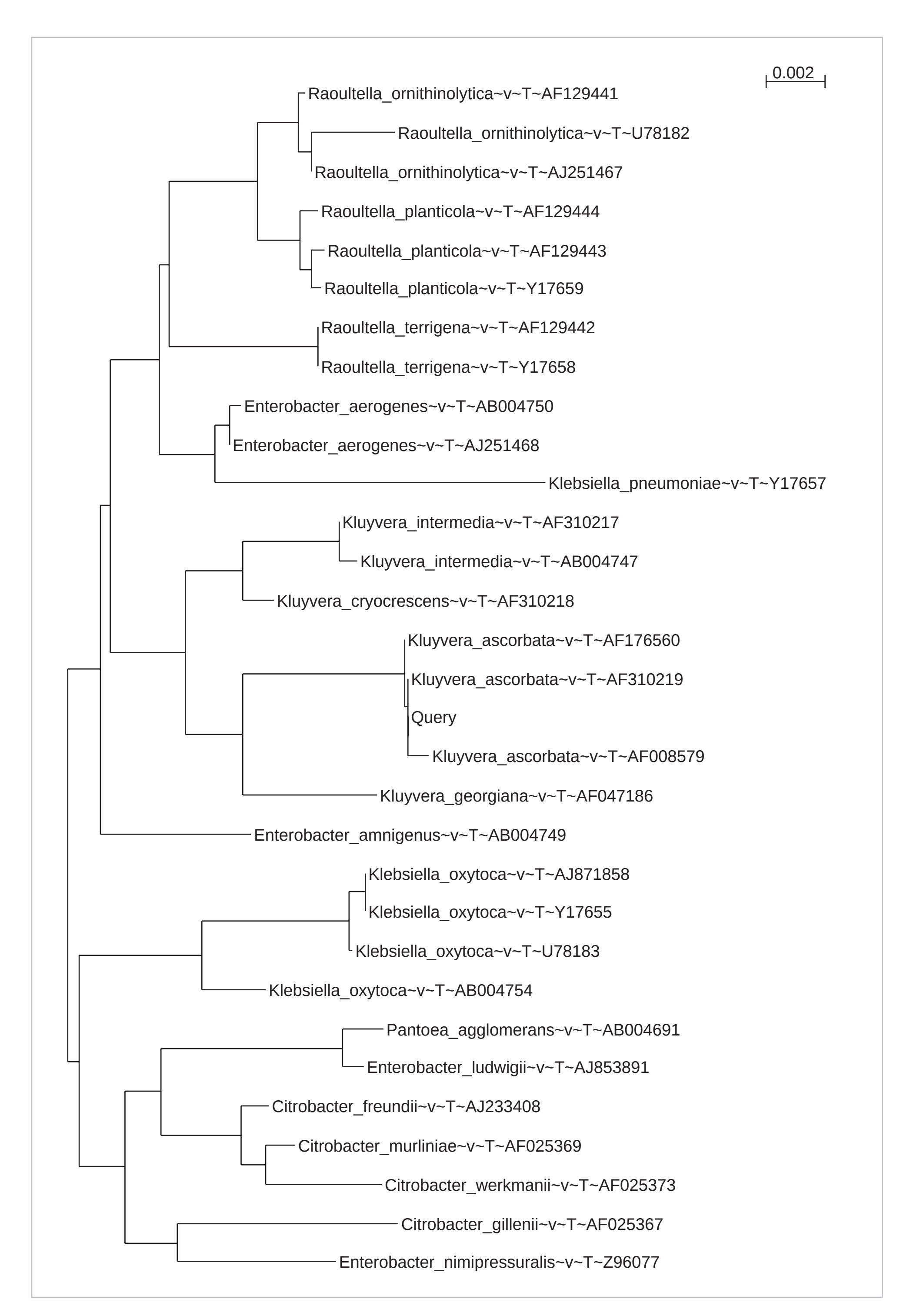


Fig. 7.2 Exemple de représentation graphique d'une identification d'une souche d'entérobactérie par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S avec BIBI.

Plus rarement, il est possible d'utiliser un métamoteur, c'est-à-dire un site Internet où une même recherche est lancée simultanément sur plusieurs moteurs de recherche, les résultats de la recherche en liens URL étant finalement fusionnés pour l'internaute. Citons Kartoo, Seek.fr, ou encore ApocalX. À ce titre, ce métamoteur (http://search.apocalx.com) apparaît judicieux, d'autant que le choix d'une des six langues est simple et rapide par un simple clic (allemand, anglais, espagnol, français, italien, portugais).

Le nombre de moteurs de recherche est donc important, avec Alapage, AltaVista, Ask, Baidu (dénommé le « Google chinois »), Bing, Blekko, DuckDuckGo, Ecosia, Ethicle, Exalead, Google, Optimal Search, PubGene, PubMed, SearchMedica, Scroogle, Yahoo !, Yandex, ou encore Yauba.

Certains sont dits généralistes et d'autres sont plus spécialisés ou professionnels comme PubMed, moteur de recherche bibliographique très connu du monde médical, ou encore SearchMedica ou PubGene, moteurs de recherche biomédicaux encore peu utilisés en France.

Si nombre de moteurs de recherche existent, seuls prédominent les moteurs américains comme Google (avec 65,2 % des parts de recherche en 2012), Yahoo ! (4,9 % des recherches), ou le moteur de recherche chinois Baidu (8,2 % des recherches).

De multiples exemples concernant l'émergence de souches pathogènes ou la diffusion de nouveaux mécanismes de résistance montrent la nécessité de rechercher quelquefois sur plusieurs sites, en particulier Google ou Yahoo ! qui donnent accès à une plus large information que PubMed tels articles de journaux, rapports en santé publique, avertissements auprès du corps médical, recommandations, conférences en diaporamas, etc. Cependant, la pertinence des liens ou sites obtenus sera fonction du choix de plusieurs mots clés judicieusement choisis, en particulier en anglais.

Pour ce qui est de la recherche de vidéos consultables gratuitement sur plusieurs moteurs de recherche tels Google, Yahoo ! ou encore Bing, aucune évaluation n'a été faite à ce jour. Leur recherche est identique à celle d'adresses URL ou sites, donc aisée et tout aussi rapide. Le choix de plusieurs mots clés judicieusement choisis et en anglais se trouve à nouveau d'actualité.

Cependant, quelles que soient les requêtes, il s'agira le plus souvent de vidéos généralistes à l'origine développées par les grands médias, essentiellement américains. Cependant, des vidéos intéressantes sont aisément visionnables lors de requêtes fondées sur des mots clés professionnels comme « superbugs », « NDM-1 », « MRSA », etc. Ce type de communication se développe rapidement au niveau professionnel avec l'enseignement universitaire et la formation à distance (FAD), ce qui entraîne souvent une sélection, et donc un identifiant et un login. À titre d'exemple, il conviendra de consulter le site de l'Université médicale virtuelle francophone ou UMVF (www.umvf.prd.fr), celui de l'enseignement supérieur (www.canal-u.tv) ou encore celui du Collège de France (www.college-de-france.fr/default/EN/all/college/index.htm).

Une forme plus simple d'information est aussi développée sur ces mêmes sites par l'éventuelle exportation de « podcasts », enregistrements sonores uniquement. Ceux-ci sont maintenant privilégiés dans l'enseignement universitaire de type DCEM-1 par exemple en France.

Si la recherche de visioconférences est encore décevante, il convient de ne pas ignorer celle des images. Là encore, il est nécessaire de consulter divers sites pour obtenir des images de Gram de différentes espèces ou d'iconographie concernant les maladies bactériennes. En général, les sites internationaux sont plus riches que les sites nationaux tels que microbes-edu.org. Il est important également de bien cibler sa recherche et de préférer à une interrogation telle que « bacille du charbon » une requête *Bacillus anthracis*, anthrax, Gram, *blood culture* qui a plus de chances de mettre à disposition des images de Gram et des iconographies de cas de charbon humains ou animaux.

Une dernière évaluation, sans réponse actuellement, est celle de la pertinence des réponses à des questions techniques lors d'interrogation sur des forums ou groupes comme sur Google. Un exemple d'actualité serait : « Puis-je obtenir des renseignements sur la spectrophotométrie de masse ou MALDI-TOF en pratique de diagnostic ? » Les réponses obtenues font référence à plusieurs groupes étrangers dont la langue d'échange sera l'anglais. Cependant, rien ne vous empêche de créer votre groupe en langue française ou encore votre blog !

La bio-informatique

La bio-informatique est une discipline nouvelle en constant développement des sciences de la vie s'appuyant sur divers outils informatiques (avec plus de 350 logiciels actuellement), pour stocker, analyser et visualiser diverses données biologiques. Internet y joue un rôle essentiel. Les biologistes médicaux y ont de plus en plus accès non seulement pour l'analyse de leurs séquences après PCR, mais aussi pour des analyses plus complexes, d'autant que les banques de données se sont considérablement enrichies en quelques années (EBI avec EMBL databank et Uniprot en Europe, NCBI avec Genbank aux États-Unis, et DDBJ au Japon). Il est ainsi devenu possible en quelques minutes d'extraire plusieurs dizaines, voire centaines de séquences à partir d'une séquence PSI ou *protein similarity research* (www.ebi.ac.uk/Tools/sss/psiblast/). L'analyse comparative de séquences, qu'elles soient désoxyribonucléotidiques ou protéiques, est devenue aisée et rapide avec divers logiciels d'alignement multiple (MSA ou *multiple sequence alignment*) : Clustal, Muscle, T-Coffee, Mafft, etc. (www.ebi.ac.uk/Tools/msa, www.genome.jp/tools/clustalw).

Après alignement multiple (Figure 7.3), il est possible d'obtenir une séquence consensus, mais aussi de visualiser rapidement les différences de résidus dans telle ou telle localisation et d'envisager les particularités d'une séquence, d'identifier de nouveaux résidus ou encore un éventuel rôle pour une extension ou une restriction du spectre d'hydrolyse d'une enzyme (www.jalview.org).

Parmi d'autres applications, citons la classification moléculaire d'un type de gène ou de protéine dérivant de la phylogénie. Internet offre l'accès à de multiples sites afin d'effectuer des analyses phylogénétiques à l'aide de plusieurs méthodes (UPGMA, Neighbor Joining, PhyML/maximum de vraisemblance et enfin beaucoup plus longue, méthode bayésienne, http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html). L'existence de plateformes favorise maintenant ces analyses telles que EBI (www.ebi.ac.uk) ou encore Mobyle (http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py).

Un autre aspect offert par Internet est celui de la biologie structurale ayant pour objet de reconstruire des modèles moléculaires, donc une reconstruction tridimensionnelle, par l'analyse des données issues, le plus souvent, d'analyses cristallographiques (diffraction des rayons X), ou encore de résonance magnétique nucléaire, de cryomicroscopie électronique voire de diffusion aux petits angles (diffusion des rayons X ou celle des neutrons). Ces données sont utilisées pour calculer un modèle de la structure 3D (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do).

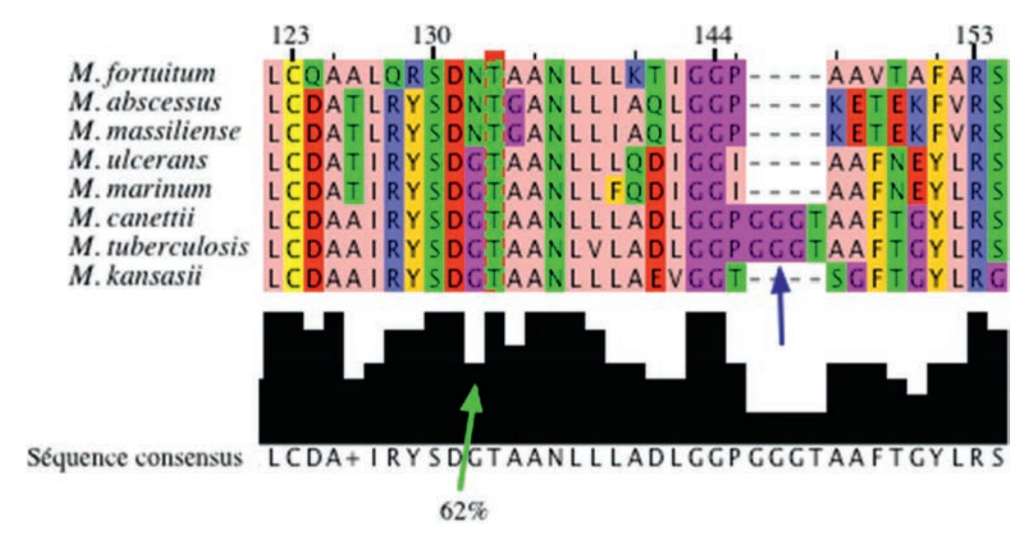


Fig. 7.3 **Alignement multiple/MSA (muscle) d'un fragment protéique de bêta-lactamase de classe A chez diverses mycobactéries et de représentation graphique sur le Site Jalview.** Cet exemple illustre l'existence de résidus strictement conservés (S130D131G144 par exemple) avec un résidu inhabituel (G132). La séquence consensus peut être précisée ainsi que le pourcentage par résidu en cliquant sur l'acide aminé sélectionné (flèche verte). Enfin, une insertion (indel) de quatre résidus est à noter pour certaines espèces (flèche bleue).

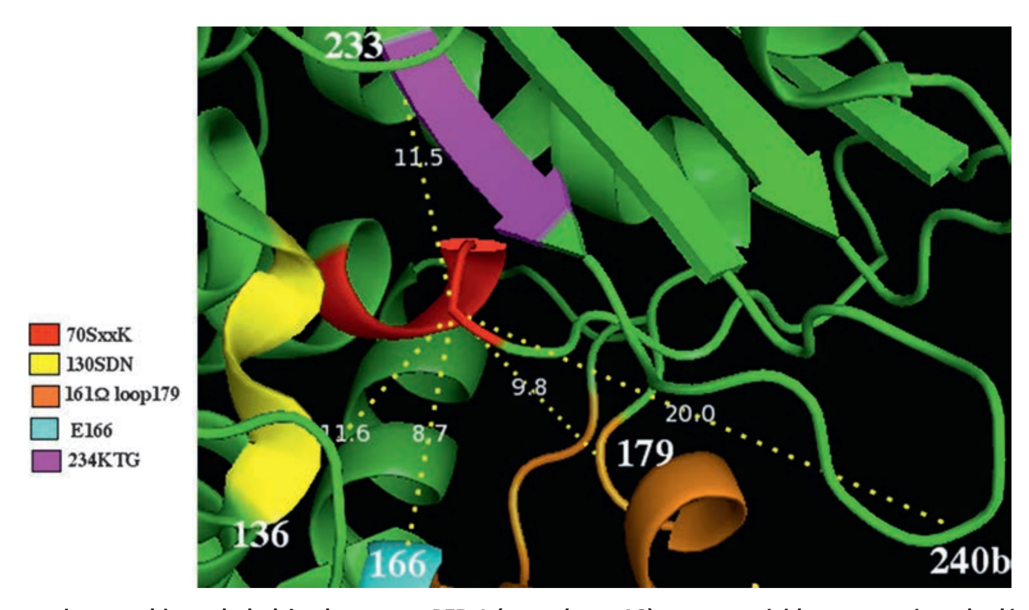


Fig. 7.4 **Représentation graphique de la bêta-lactamase PER-1 (sous-classe A2) avec ses résidus conservés et la détermination des distances (Å) entre la Ser70 et d'autres résidus tels Asp136, Glu166, Asn179, His233, et 240b (insertion de résidus), sur le site PyMOL.**

Un excellent modèle d'analyse graphique est mis à disposition gracieusement par PyMOL (Figure 7.4) (www.pymol.org). Enfin, il est à noter l'accès aisé à diverses informations pédagogiques par Google.

Conclusion

Internet a bouleversé nos vies, personnelle et professionnelle. Cette révolution numérique est en train de supplanter celle de Gutenberg pour certains. L'intérêt pour Internet ne s'est nullement démenti depuis son utilisation par les biologistes dans les années 1995, et ce malgré l'éclatement de la bulle en 2000 avec la perte de 200 à 300 milliards de dollars évaporés en 2 ans. Les promesses sont tenues et son développement reste exponentiel. Cependant, ce succès est lié à d'autres découvertes extraordinaires dans l'informatique, et plus précisément le numérique. Les outils sont maintenant forgés, il reste à mieux les utiliser.

Si la recherche d'informations est aujourd'hui couronnée de succès, le développement du e-learning ou encore celui de la formation à distance est très insuffisant en France. Or cette modalité de e-FMC (formation médicale continue) est aussi efficace que les formations dites présentielles. Par ailleurs, les sites de e-FMC avec obtention de crédits sont très nombreux en langue anglaise, contrairement à ceux en langue française. Cela suppose une plus grande implication des profession-

nels, en particulier en santé. Enfin, l'accréditation des sites est devenue effective en Amérique du Nord alors qu'elle commence juste à être formalisée en France. Il est vrai que le seul logo HON (Health on the Net Foundation) a peu d'incidence sur la qualité du contenu. En France, les rares sites à destination des biologistes ont été supprimés ces dernières années, tels que Bioforma avec Bacterionet, Medicimage et Spermionet, qui avait développé depuis plusieurs années des formations à distance (www.bioforma.net). Bacterionet® avait ainsi constitué une banque de plus de 80 observations cliniques, des vidéoconférences, etc.

Il existe d'autres perspectives. Si vous avez la chance d'être universitaire, vous pouvez accéder de chez vous, de votre lit même, à la bibliothèque de votre Université, et donc aux nombreuses revues en ligne à n'importe quelle heure du jour et de la nuit. Les modalités d'abonnement pour un particulier ne permettent pas encore une telle aisance pour la recherche bibliographique. Toutefois, le paiement en ligne (*pay-per-view*) pour consulter un article détecté grâce à Google et l'exporter sur votre ordinateur (en document pdf) est devenu banal.

Sécurité biologique au laboratoire de bactériologie

N. Pestourie, M. Mounier, N. Hidri, M.-C. Ploy, F. Denis

PLAN DU CHAPITRE

Les laboratoires de bactériologie sont des lieux particulièrement exposés au risque infectieux puisque, du fait de l'activité exercée, tous les agents biologiques sont susceptibles d'y être manipulés. De plus, la conscience de ce risque est bien souvent minimisée puisque le personnel est souvent plus soucieux de protéger le prélèvement que de se protéger lui-même.

Ces laboratoires ne sont pas exempts des autres risques (chimiques, radioactifs, etc.) qui ne seront pas pris en considération dans ce chapitre.

Le Code du travail (article L.230-2) prévoit que les mesures nécessaires doivent être prises pour « assurer la sécurité physique et mentale des travailleurs » sur la base des principes généraux de prévention :

- éviter les risques;
- évaluer les risques qui ne peuvent pas être évités;
- combattre les risques à la source;
- adapter le travail à l'homme (postes de travail, équipements, méthodes de travail, etc.);
- tenir compte de l'évolution de la technique;
- remplacer ce qui est dangereux par ce qui n'est pas dangereux ou par ce qui est moins dangereux;
- planifier la prévention;
- prendre des mesures de protection collective en leur donnant la priorité sur les mesures de protection individuelle;
- donner les instructions appropriées aux travailleurs.

L'article L.231-62 précise que l'évaluation du risque d'exposition à des agents biologiques tient compte de leur classification, mais également de « toutes les informations disponibles et notamment celles relatives aux infections susceptibles d'être contractées du fait de l'activité professionnelle par le travailleur et de celles concernant les effets allergisants et toxiques pouvant résulter de l'exposition aux agents biologiques ».

Ces données générales s'appliquent bien sûr aux laboratoires de microbiologie où l'évaluation du risque devra prendre en compte toutes les étapes de l'analyse depuis le prélèvement, son acheminement, sa prise en charge et son analyse au laboratoire jusqu'au rendu du résultat en n'oubliant pas la gestion des déchets.

Il faut d'emblée souligner le fait qu'aucune enceinte de sécurité, installation ou méthode ne peut, à elle seule, garantir la sécurité si l'opérateur ne respecte pas les recommandations et les techniques sécurisées reposant sur une formation et une information solides.

Risque infectieux

Classiquement, dans le cadre de la gestion des risques, le risque correspond à l'exposition au micro-organisme avec deux corollaires : la présence du micro-organisme = le danger, et la contamination = le dommage.

L'évaluation du risque infectieux est donc étroitement dépendante du micro-organisme lui-même, mais aussi du mode d'exposition favorable ou non à la contamination.

La **sécurité biologique** regroupe des mesures techniques et des pratiques mises en œuvre pour protéger les personnels et l'environnement des risques liés aux agents biologiques pathogènes (micro-organismes et toxines). Elle repose, entre autres, sur les mesures définies par l'arrêté du 16 juillet 2007.

La **sûreté biologique** est l'ensemble des mesures de protection contre le vol, le détournement et le mauvais usage de souches de micro-organismes hautement pathogènes ou de toxines dangereuses pour l'homme et de tout produit en contenant, utilisables dans le cadre d'actions bioterroristes.

Classification des micro-organismes

Dans le cadre de la sécurité biologique

Au titre de la directive 2000/54/CE du Parlement et du Conseil de l'Europe du 18 septembre 2000 concernant la protection des travailleurs contre les risques biologiques au travail, un micro-organisme est défini comme « une entité microbiologique, cellulaire ou non, capable de se reproduire ou de transférer du matériel génétique ».

Les textes réglementaires européens et français définissent des critères qui permettent de classer les micro-organismes en quatre groupes en fonction de l'importance du risque d'infection qu'ils présentent pour une personne en bonne santé.

Les critères de classification sont schématisés dans le tableau 8.1 et des extraits de la classification des bactéries sont présentés dans le tableau 8.2.

À cette classification de groupe à risque correspondent des conditions de manipulations des micro-organismes spécifiques, codées par les mêmes chiffres : 2, 3 ou 4.

Toutefois, un aspect limitant de cette classification tient au fait qu'elle laisse peu de latitude pour l'évaluation continue et dynamique des risques, d'autant que le risque peut se trouver modifié du fait des quantités manipulées, d'activités

Tableau 8.1 **Critères de classification des agents pathogènes d'après l'arrêté du 18 juillet 1994 modifié par les arrêtés du 17 avril 1997 et du 30 juin 1998 et la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000.**

Groupe	1	2	3	4
Pathogénicité chez l'homme	Non	Oui	Oui	Oui
Danger pour l'opérateur		Oui (modéré)	Oui (haut risque)	Oui (haut risque)
Propagation dans la collectivité		Peu probable	Possible	Risque élevé
Existence d'une prophylaxie ou d'un traitement efficace		Oui	Oui	Non
Exemples	*Bacillus subtilis*	*S. aureus*, *S. pyogenes*, *A. fumigatus*, virus de la rougeole, etc.	*Mycobacterium tuberculosis*, *Histoplasma capsulatum*, VIH, VHB, VHC, etc.	Virus Lassa, Marburg, Ébola, etc.

Tableau 8.2 **Bactéries du groupe 3 (extrait de la directive 2000/54/CE du 18 septembre 2000, Annexe III).**

Agent biologique	Classification	Modes de contamination
Bacillus anthracis	3	Cutané
Bartonella quintana	3	
Brucella abortus, B. canis, B. melitensis, B. suis	3	Cutané-aérien
Chlamydia psittaci (souches aviaires)	3	
Coxiella burnetii	3	
Escherichia coli, souches cytotoxiques (ex. : O157:H7 ou O13)	3*	
Francisella tularensis	3	Cutané
Mycobacterium africanum	3	Aérien
Mycobacterium bovis (à l'exception de la souche BCG)	3 V	
Mycobacterium leprae	3	Cutané-aérien
Mycobacterium microti	3*	
Mycobacterium tuberculosis	3 V	Aérien
Mycobacterium ulcerans	3*	Cutané
Burkholderia mallei	3	Cutané
Burkholderia pseudomallei	3	Cutané
Rickettsia akari	3*	
Rickettsia canada	3*	
Rickettsia conorii	3	
Rickettsia montana	3*	
Rickettsia typhi	3	

Rickettsia prowasekii	3	
Rickettsia rickettsii	3	
Orientia tsutsugasmushi	3	
Salmonella Typhi	3*V	Digestif
Shigella dysenteriae (type 1)	3*	Digestif
Yersinia pestis	3 V	

V : vaccin efficace disponible.
* Ces agents biologiques peuvent présenter pour les travailleurs un risque d'infection limitée parce qu'ils ne sont pas normalement infectieux par l'air.

spécifiques ou même de nouveaux micro-organismes non listés. Cet ensemble de critères ne doit pas être négligé au laboratoire et doit imposer une évaluation adaptée du risque qui peut s'avérer :

- accru du fait de la manipulation de l'agent biologique en culture, chez l'animal, etc. ;
- relativisé du fait de l'absence d'infectiosité par voie aérienne.

Une approche « pratique » pour évaluer le risque pathogène d'un micro-organisme, en fonction du contexte de manipulation, devrait au minimum tenir compte des critères ci-après :

- pathogénicité de l'agent infectieux et dose infectante ;
- mode de transmission « normal » (voies respiratoire, digestive, cutanéomuqueuse) ;
- modes de contamination liés aux manipulations au laboratoire, en particulier potentiel de génération d'aérosols ;
- activité du laboratoire (concentration, sonication, centrifugation, etc.) ;
- manipulation génétique (travail sur les micro-organismes recombinants : gènes codant un facteur de virulence, une toxine, etc.) ;
- circonstance d'exposition ;
- stabilité de l'agent dans l'environnement ;
- concentration de l'agent et volume de matériel contaminant manipulé ;
- présence d'un hôte réceptif ;
- existence de mesures préventives efficaces ;
- existence d'un traitement efficace.

Dans le cadre de la sûreté biologique

La liste des micro-organismes et toxines concernés est fixée par l'arrêté du 30 avril 2012 modifié par l'arrêté du 6 novembre 2014.

Concernant la bactériologie, on retrouve dans cette liste :

1. Micro-organismes et toxines hautement pathogènes, présentant les risques les plus élevés pour la santé publique :
   - *Yersinia pestis* ;
   - *Mycobacterium tuberculosis* ultrarésistante (résistance à l'isoniazide, la rifampicine, n'importe quelle fluoroquinolone, et à la capréomycine ou à la kanamycine ou l'amikacine).
2. Les organismes génétiquement modifiés issus ou intégrant des éléments génétiques des micro-organismes sus-mentionnés.
3. Les organismes et toxines désignés ci-après ainsi que les organismes génétiquement modifiés renfermant des séquences d'acides nucléiques des micro-organismes désignés ci-après ou renfermant des séquences d'acides nucléiques codant une des toxines désignées ci-après ou une sous-unité de l'une de ces toxines :
   - *Bacillus anthracis* ;
   - toutes les *Brucella* sauf B. *ovis* ;
   - *Burkholderia mallei* ;
   - *Burkholderia pseudomallei* ;
   - *Clostridium botulinum* ;
   - *Clostridium perfringens*, types producteurs de la toxine *epsilon* ;
   - *Francisella tularensis* ;
   - *Coxiella burnetii* ;
   - *Rickettsia prowasekii* ;
   - *Rickettsia rickettsii* ;
   - l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* ;
   - les toxines botuliques ;
   - la toxine epsilon de *Clostridium perfringens*.

Les laboratoires qui manipulent et conservent ces micro-organismes et toxines (au-delà de 30 jours) doivent mettre en place des mesures de sécurité biologique mais aussi de sûreté biologique.

Celles-ci consistent en l'obtention d'une autorisation délivrée par l'Autorité nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) une traçabilité des mouvements de ces micro-organismes et toxines, un bilan annuel à remettre à l'ANSM.

« Toute opération de transport, de cession, d'importation, d'exportation, d'offre ou d'acquisition de micro-organismes ou de toxines précités doit être inscrite sur un registre spécial coté et paraphé par le maire ou le commissaire de police ou enregistrée par un système informatique spécifique répondant à des conditions particulières de sécurité » selon l'article R.5139-1.

« Sont dispensées des opérations mentionnées à l'article R.5139-1 :

1. Les opérations relatives aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro et aux réactifs contenant des micro-organismes ou des toxines lorsqu'ils contiennent des micro-organismes ou des toxines qui ont fait l'objet d'une inactivation, ou d'une atténuation décrite dans la documentation afférente aux articles R.5221-15 et R.5221-17.
2. Les opérations autres que la cession, l'importation et l'exportation réalisées par les établissements recevant des échantillons biologiques aux seules fins d'analyse de biologie médicale ou vétérinaire. Cette dispense vaut seulement pour les échantillons biologiques conservés moins de trente jours au sein de ces établissements, sauf décision contraire du ministre chargé de la santé, du juge administratif ou du juge judiciaire ».

Modes de transmission

La connaissance des modes de transmission est indispensable pour appréhender le risque de contamination lors des manipulations. En effet, il est évident que la contamination ne pourra provenir que d'une exposition correspondant au(x) mode(s) de transmission du micro-organisme. Ainsi, un aérosol fait de micro-organismes non pathogènes par voie respiratoire ne constitue pas un risque. En revanche, il faudra être vigilant pour des portes d'entrée inhabituelles, dues aux manipulations de laboratoire et qui peuvent alors constituer un risque réel, au moins local, d'infections (par exemple abcès par inoculation accidentelle d'une suspension de *Mycobacterium tuberculosis*, transmission de toxoplasmose après morsure par animal infecté, etc.).

Voie respiratoire

La contamination par voie aérienne ou respiratoire résulte de l'inhalation de particules infectieuses véhiculées sous forme d'aérosol.

Le risque d'exposition aux aérosols représente un risque réel au laboratoire. Plus la particule est petite et plus la vitesse est grande, plus le risque d'aérosolisation est élevé. Ce phénomène n'étant pas macroscopiquement visible au quotidien, sa reconnaissance et son évaluation sont complexes. On estime pourtant que c'est le mode de contamination le plus fréquent au laboratoire. Le risque le plus important se situe dans l'environnement immédiat de la formation de l'aérosol, mais il peut s'étendre à la faveur de courants d'air ou de pollutions massives (bris de flacons de culture, etc.).

En pratique, au laboratoire, les aérosols sont dus :

- à la rupture de film liquide à l'orifice d'un flacon, à l'extrémité d'une pipette ou au contact d'une anse d'ensemencement;
- au mélange gaz–liquide occasionné par l'agitation d'une culture, d'une éprouvette, ou du fait d'un brusque rejet de liquide hors d'une pipette ou d'une seringue qui contenait quelques bulles d'air;
- au flambage d'anses d'ensemencement en métal, au passage d'un récipient à la flamme, qui, sous l'effet de la chaleur, provoque la « vaporisation » explosive de liquides résiduels, si rapidement que les gouttelettes expulsées contiennent des micro-organismes encore vivants;
- aux vibrations induites lors de l'utilisation de certains appareils (ultrasons, vortex, etc.) projetant des gouttelettes par effet « catapulte »;
- à l'« explosion » d'une goutte qui tombe sur une surface et engendre la formation de gouttelettes secondaires, plus importante s'il y a accélération comme celle provoquée par l'expulsion du résidu d'une pipette;
- à la centrifugation qui, par les mouvements d'accélération, de freinage, entraîne des vibrations, sources importantes de production d'aérosols;
- à l'ouverture de récipients sous vide; le grattage, la filtration de matériels desséchés, lyophilisés favorisent l'émission de petites particules.
- à l'ouverture de boîtes de subcultures ou à l'examen olfactif des dites boîtes, en particulier lorsqu'il s'agit de *Brucella* ou de *Francisella* (l'arrêté du 16 juillet 2007 interdit clairement la pratique de l'examen olfactif).

Voie orale

La contamination orale est due à l'ingestion de micro-organismes. Elle peut être :

- « directe » lors d'un pipetage à la bouche qui non seulement ne doit plus être pratiqué, mais de plus doit être formellement proscrit;
- indirecte par :
  - contact de la bouche avec les mains (geste réflexe, onychophagie, etc.), ou des objets souillés (stylos, cigarettes, etc.);
  - consommation de boissons ou d'aliments car ils sont susceptibles d'être contaminés par des mains souillées.

Le respect des règles d'hygiène de base (lavage et/ou désinfection des mains, port de gants à condition de les utiliser correctement) constitue une mesure prophylactique efficace.

Voie cutanéomuqueuse

La contamination par voie cutanéomuqueuse est la résultante :

- soit d'une effraction cutanée accidentelle (coupure, piqûre ou, dans un contexte d'animalerie, morsure ou griffure);
- soit d'une projection ou d'un contact direct sur peau lésée, ou même sur peau saine, certaines bactéries pouvant traverser la peau (*Leptospira*, *Brucella*, *Francisella*, etc.);
- soit d'une projection sur les muqueuses (surtout conjonctives).

La mise en place de procédures écrites, validées et évaluées pour prévoir la conduite à tenir en cas d'accident (accident d'exposition au sang [AES] et autres) doit être systématique dans un laboratoire de microbiologie.

Conception du laboratoire

Un laboratoire bien conçu est la première mesure de prévention qui permet de protéger les personnes en leur fournissant des locaux adaptés en surfaces, équipements (y compris sols, murs, paillasses, etc.), circuits.

Cadre réglementaire et normatif

Le décret fixant les conditions d'autorisation des laboratoires d'analyse de biologie médicale (n° 95-1321 du 27 décembre 1995, modifiant le décret n° 76-1006 du 4 novembre 1976) indiquait quelques obligations en termes de superficie et de nombre de pièces : réception, secrétariat, archives, salle de prélèvements, laverie et deux salles affectées aux activités de laboratoire dont une réservée exclusivement aux activités de bactériologie, virologie, mycologie et parasitologie.

Le Guide de bonne exécution des analyses ou GBEA (arrêté du 26 novembre 1999, relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale) précise que « l'aménagement du laboratoire doit permettre d'isoler les activités susceptibles d'entraîner une contamination de l'opérateur et/ou de l'analyse et éviter une pollution tant à l'intérieur qu'à l'extérieur [...] ».

La norme NF 15 189 version de novembre 2012 rappelle : « le laboratoire doit avoir un espace dédié à l'exécution des activités pour garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité

des prestations offertes aux utilisateurs, ainsi que la santé et la sécurité du personnel du laboratoire, des patients et des visiteurs ».

L'arrêté du 16 juillet 2007, « fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes », précise clairement la conception et l'aménagement des locaux. Il définit dans son annexe 1 les mesures techniques générales de prévention et de confinement minimales à mettre en œuvre ainsi que, dans son annexe 2, les niveaux de confinement minimaux à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, de développement et d'enseignement où sont utilisés des agents biologiques pathogènes des groupes 2, 3 ou 4 (Tableau 8.3).

D'une manière générale, pour prévenir le risque infectieux dans un laboratoire de microbiologie, on peut considérer que la manipulation des micro-organismes nécessite un niveau de protection (confinement) équivalent à la classification en groupe (Tableaux 8.1 et 8.2).

Conception générale

La démarche à adopter lors de la conception d'un laboratoire de biologie médicale est décrite dans le guide édité par l'Institut national de recherche et de sécurité (INRS) « Conception des laboratoires d'analyses biologiques ».

L'accès sera limité aux seuls travailleurs habilités et les circuits seront prévus pour favoriser la « marche en avant » et privilégier le positionnement des équipements au plus près de leur utilisation pour éviter les risques liés au transport des produits biologiques (prélèvements, cultures, etc.).

Tableau 8.3 **Mesures de confinement, arrêté du 16 juillet 2007, annexe 2.**

Mesures de confinement dans les salles dédiées aux activités techniques (analyses microbiologiques, mycologiques ou parasitologiques)	Niveaux de confinement	
	2	3
Conception		
1. Accès via un sas muni de portes asservies ne pouvant pas s'ouvrir simultanément	Non	Oui
2. Possibilité de fermer hermétiquement la salle dédiée aux activités techniques pour permettre la désinfection	Optionnel	Oui
3. Filtration de l'air entrant dans la salle dédiée aux activités techniques (filtre à particule à très haute efficacité : HEPA)	Non	
4. Filtration de l'air extrait de la salle dédiée aux activités techniques (filtre HEPA)	Non	
5. Fenêtres fermées pendant la manipulation	Oui	
6. Maintien d'une pression négative dans la salle dédiée aux activités techniques par rapport aux zones voisines	Non	
7. Système d'alarme pour détecter tout changement anormal de la pression de l'air	Non	
8. Approvisionnement en énergie électrique de secours	Non	
9. Système de ventilation de secours	Non	
Aménagements internes		
1. Présence au moins d'un poste de sécurité microbiologique	Oui[1]	
2. Surfaces imperméables à l'eau, résistantes aux agents de nettoyage et de désinfection sans endroits inaccessibles au nettoyage	Oui : sols et murs[2]	Oui : sols, murs et plafonds[2]
3. Présence d'une douche à proximité de la salle dédiée aux activités techniques	Non	Optionnel
4. Présence d'un autoclave	Optionnel. Si oui, facilement accessible et, si possible, dans le bâtiment	Oui, dans la salle dédiée aux activités techniques, à double entrée ou à proximité immédiate[3]
Pratiques opératoires		
1. Inactivation des déchets contaminés avant leur sortie de l'établissement	Optionnel	Oui
2. Inactivation des agents biologiques dans les effluents par des moyens appropriés	Optionnel	Oui

Oui : exigence. Non : pas d'exigence. Optionnel : doit être décidé, au cas par cas, sur la base de l'évaluation des risques, à la suite de laquelle ces mesures devront – ou non – être appliquées.

1. Pour les installations existantes, cette exigence est applicable au plus tard 3 ans après la publication du présent arrêté.
2. Pour les installations existantes, cette exigence est applicable au plus tard 2 ans après la publication du présent arrêté.
3. Mise en place de procédures validées, permettant le transfert vers un autoclave extérieur au local, conférant la même protection, et contrôlées dans leur déroulement.

Toutes les surfaces en contact avec les produits biologiques, quel que soit le niveau de risque, seront imperméables à l'eau, résistantes aux acides, bases, solvants, désinfectants. Elles seront faciles à nettoyer et à désinfecter (surfaces lisses). Pour les sols, des remontées en plinthes, sans angles droits, prolongeant les revêtements de sols permettront un nettoyage efficace. De même, les plans de travail seront lisses, non poreux, sans joints et avec une remontée au bord externe pour éviter les écoulements de liquides si un accident survient.

Des postes de lavage des mains, exclusivement réservés à l'hygiène des mains, correctement équipés, seront installés dans toutes les pièces ayant une activité de laboratoire ou de prélèvement. Il faudra prévoir un espace suffisamment haut entre le robinet et l'évacuation pour pouvoir laver les mains et les avant-bras.

On veillera également à l'ergonomie du poste de travail, avec en particulier des sièges stables et adaptés aux différences de morphologie entre les personnes (réglages de la hauteur, barre d'appui des pieds, etc.).

Les postes informatiques (clavier et souris), de même que les téléphones sans fil sont des « repères » à bactéries et des sources d'exposition importantes aux micro-organismes, d'où l'importance d'une vigilance particulièrement accrue pour ce type de matériel. Les solutions hydroalcooliques peuvent être un moyen efficace pour éviter la contamination de l'environnement, à condition qu'elles soient correctement utilisées avant la manipulation de ces objets.

Zones confinées

La manipulation de produits biologiques requiert des conditions strictes qui sont réglementées en fonction du classement du micro-organisme manipulé. Les zones de travail seront donc plus ou moins sécurisées en fonction de ce risque, l'objectif étant de faire en sorte que le micro-organisme ne puisse pas diffuser à l'extérieur de la zone où il est manipulé. Le confinement qui en résulte est plus ou moins poussé en fonction du risque évalué.

Le confinement est un « acte d'isolement » qui, pour le risque biologique, a été mis en œuvre il y a fort longtemps avec la pratique de mise en quarantaine, cantonnant dans un lieu les personnes « contagieuses » pour éviter les épidémies.

Le mot a pris ses lettres de noblesse dans le domaine de l'industrie atomique où le manipulateur et le produit à risque sont séparés physiquement. Depuis, la diversification des applications (industrie, santé, agriculture, enseignement et recherche) s'est accompagnée d'un grand nombre de recommandations, textes réglementaires, décrets et normes tentant d'encadrer le sujet ; il en a résulté plusieurs classifications. Toutefois, la désignation la plus courante va de 1 à 4, où 4 est le risque majeur, précédé d'une lettre spécifique au domaine d'application ou à l'activité.

Le confinement a pour but essentiel de protéger les personnes en présence d'un risque dont le vecteur est l'air et le champ d'application concerne, bien sûr, les micro-organismes pathogènes, mais aussi les produits chimiques toxiques. Les moyens mis en œuvre doivent protéger l'activité, l'environnement et en première ligne l'opérateur. Il s'agit le plus souvent de locaux spécifiques où les moyens architecturaux (locaux en dépression, traitement de l'air, etc.) vont de pair avec des règles strictes de comportement (tenue, ouverture des portes, gestion des déchets, etc.). Le tableau 8.3 rapporte les mesures de confinement dans les laboratoires de microbiologie pour les niveaux de 2 à 3.

L'arrêté du 23 janvier 2013 relatif aux règles de bonnes pratiques tendant à garantir la sécurité et la sûreté biologiques engage les établissements comportant des laboratoires ou des installations de confinement à adopter une véritable démarche qualité et de gestion des risques.

Postes de sécurité microbiologique (PSM)

Les postes de sécurité microbiologique (PSM) sont des enceintes de sécurité pour manipuler les micro-organismes dès le niveau 2 (Tableau 8.3).

Généralités

Terminologie

Les **sorbonnes** sont des espaces de travail parfaitement fermés et ventilés par l'induction d'un courant d'air destiné à diluer les polluants chimiques pour les évacuer, via le rejet dans l'atmosphère. Elles ne peuvent en aucun cas être utilisées lors d'une utilisation à des fins microbiologiques.

Seuls les **postes de sécurité microbiologique (PSM)** proposent une protection de l'opérateur face à une contamination aérienne et, suivant la catégorie du PSM, un confinement dynamique des produits manipulés. Ce sont des enceintes à empoussièrement contrôlé où l'air est traité puis réparti dans l'enceinte en « flux laminaire vertical ». Mais les PSM ne sont pas de simples flux laminaires et doivent impérativement être conformes à la norme EN 12469 et sont, en France, certifiés par le laboratoire national d'essai (LNE). Ils sont alors reconnaissables car le fabricant ou l'importateur doit inscrire sur la face avant les indications rapportées ci-après (Fig. 8.1 et 8.2).

Laminarité

La technologie du traitement de l'air en écoulement laminaire permet d'obtenir un empoussièrement rigoureusement contrôlé :

- en apportant sur le plan de travail de l'air filtré ;
- en évitant la sédimentation des particules émises par le manipulateur et ses activités.

Contrairement à un flux turbulent (mouvement d'air multidirectionnel introduit dans le volume à traiter), le flux laminaire est un flux d'air provoqué, unidirectionnel et continu. Le principe physique est d'obtenir une « laminarité » des filets



Fig. 8.1 Indications nécessaires sur la face avant d'un PSM.



Fig. 8.2 Exemple de marquage d'un PSM.

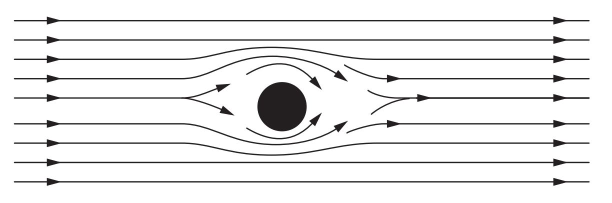


Fig. 8.3 Comportement d'un écoulement laminaire autour d'un obstacle. (V = 0,45 m/s ± 0,1 m/s).

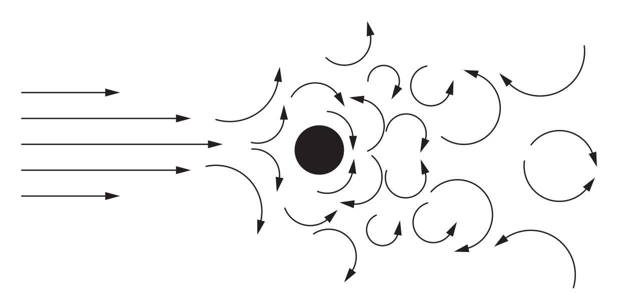


Fig. 8.4 Comportement d'un écoulement turbulent autour d'un obstacle. (V > 0,55 m/s ou V < 0,35 m/s).

d'air filtré, ceux-ci devant s'écouler en filets rectilignes, parallèles, de même vitesse et de même sens.

Ce résultat est la somme de trois conditions :

- répartition homogène de la pression délivrée par les ventilateurs de soufflage, « plenum de répartition » ;
- vitesse de soufflage de 0,45 m/s (±20 %) à l'intérieur du volume de travail ; des vitesses de soufflage supérieures ou inférieures créent des turbulences nuisant à l'écoulement du flux autour d'un obstacle (Fig. 8.3 et 8.4) ;
- filtration de l'air à très haute efficacité (filtres HEPA [*high efficiency particulate air*], à 99,999 % DOP [dioctylphtalate]).

Différents postes de sécurité microbiologique (Fig. 8.5 à 8.7)

Contrairement aux sorbonnes qui n'assurent aucun traitement de l'air, les PSM assurent au moins la filtration de l'air rejeté dans le milieu extérieur (PSM I) (Fig. 8.5) et au mieux le « confinement » dans une enceinte close (« boîte à gants » ou PSM III). Les pathogènes du groupe 4 doivent obligatoirement être manipulés dans un PSM de classe III (Fig. 8.7) et dans une zone de confinement adaptée.

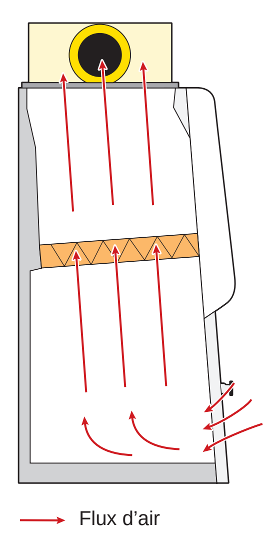


Fig. 8.5 PSM I. Ce flux assure la protection de l'opérateur par écoulement d'air vers l'enceinte placée en dépression.

Un PSM I permet de protéger le manipulateur et l'environnement (Fig. 8.5). Un PSM II permet en plus de protéger la manipulation contre les « polluants » présents dans le laboratoire (Fig. 8.6 à 8.8).

Le choix du plan de travail perforé ou plein se fera en fonction des manipulations à effectuer :

- le plan de travail perforé assure une meilleure laminarité du flux au niveau des échantillons ;
- le plan de travail plein est conseillé pour éviter le passage de contaminant dans le bac de rétention (produits pulvérulents, animaux, etc.).

> La barrière immatérielle constituée par la veine de garde n'a pas une efficacité absolue. C'est la contrepartie de la facilité d'accès à la manipulation. Toutefois, la normalisation est suffisamment rigoureuse pour qu'un PSM **bien installé, bien entretenu et bien utilisé** offre une protection efficace. Les PSM doivent être vérifiés par du personnel spécialisé au moins une fois par an (comptage de particules, vitesse de soufflage, recherche de fuite au niveau du filtre, etc.).

Comment utiliser un PSM II

La zone où est installé le PSM doit être choisie dans un environnement limitant les perturbations de l'air (pas de portes, fenêtres, passages, etc.). Il est impératif de limiter les circulations dans la pièce pendant les manipulations. Les courants d'air ainsi générés peuvent occasionner une rupture de la veine de garde risquant de provoquer des fuites de produits vers le laboratoire ou de contaminer le produit manipulé.

La constance de l'air entrant sera d'autant plus difficile à gérer que le PSM a une ouverture frontale large. Il est donc vivement conseillé de choisir la taille du PSM en fonction des manipulations et de proscrire l'usage de PSM à deux postes de travail.

Il est intéressant de rappeler de manière détaillée le principe des PSM (à titre d'exemple, ici, le PSM II ; Fig. 8.8).

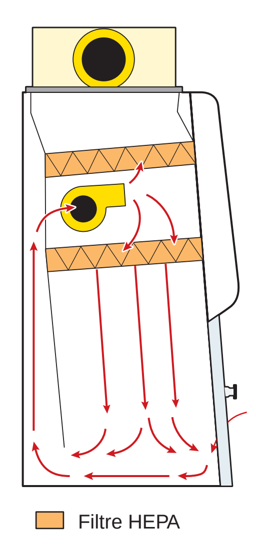


Fig. 8.6 PSM II. Le flux d'air filtré est orienté vers le produit manipulé. L'air, puisé dans l'ambiance de travail (veine de garde), est acheminé vers le plenum soit directement (PSM II A), soit après passage au travers d'un filtre HEPA (PSM II B).

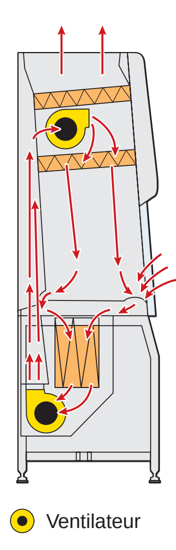


Fig. 8.7 PSM III. L'air entrant dans le PSM III est filtré de même que l'air extrait. Ce type de PSM est obligatoire pour les manipulations des agents biologiques du groupe 4.

Les distances frontales et latérales entre le PSM et les différents obstacles ainsi que la distance sous plafond doivent être conformes à celles indiquées par le constructeur.

Il est vivement conseillé de laisser le PSM en régime de veille et de le mettre en fonctionnement (régime de travail) avant la manipulation.

Une procédure de nettoyage-désinfection du PSM doit être écrite. Le nettoyage doit être pratiqué avant et après chaque manipulation à l'aide de chiffonnettes libérant peu de particules (non tissées), alors que le PSM est en marche afin d'éviter la stagnation des particules. Il est impératif de ne jamais poser un chiffon dans le PSM car celui-ci et/ou ses constituants peuvent être aspirés par le ventilateur et s'insérer dans les palettes, occasionnant une augmentation

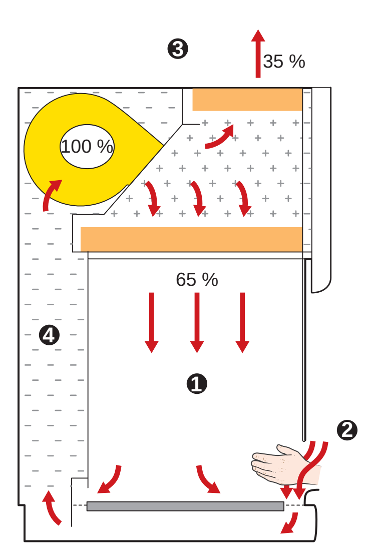


Fig. 8.8 Schéma de fonctionnement d'un PSM II. Le flux d'air qui arrive sur le plan de travail est « laminaire ». La filtration sur filtre HEPA assure la **protection de la manipulation**. **1.** L'apport d'air neuf par la façade participe à la création d'une barrière aéraulique (veine de garde) qui assure la **protection du manipulateur**. **2.** Cette barrière peut être compromise par les turbulences générées par le manipulateur ou l'encombrement excessif du plan de travail. Une quantité d'air égale à celle qui forme la veine de garde est évacuée hors de l'enceinte après filtration sur filtre HEPA : **protection de l'environnement**. **3.** Le flux est repris dans les bandeaux d'aspiration (**4**) du plan de travail puis soufflé dans le plenum de répartition et dirigé en partie vers le filtre de rejet et en partie vers la chambre de manipulation (recyclage).

du bruit, et entraîner un colmatage de filtre par augmentation de la perte de charge à laquelle le ventilateur est soumis.

Consignes de travail

Il est utile de rappeler un certain nombre de précautions à respecter pour travailler dans un PSM.

Vérification du PSM

Mettre le PSM en vitesse normale 5 à 15 minutes avant de manipuler (se référer au guide fourni par le constructeur) et vérifier le bon fonctionnement du PSM (manomètre ou indicateur visuel).

Préparation de la manipulation

- Préparer soigneusement la manipulation en réunissant au préalable le matériel nécessaire, récipient pour déchets, etc.
- Répartir les zones propres et les zones contaminées au sein du PSM et respecter un circuit du propre vers le sale sans croisement.
- Limiter au strict minimum le matériel introduit sous le PSM (perturbation du flux et réduction voire annulation de la sécurité du manipulateur).
- Éviter d'introduire sous le PSM des produits « polluants » (sources de poussières) tels que papier, gomme, crayon, carton, etc.
- Nettoyer et dépoussiérer tout objet devant être introduit dans la chambre de manipulation (risque de colmatage du filtre).

- Écrire les procédures.
- Vérifier que les grilles de reprise sont parfaitement dégagées (en particulier celles situées à l'arrière du plan de travail).

Manipulation

- Porter une tenue adaptée à la zone de confinement et, a minima, des gants, un masque et une surblouse.
- Définir et respecter la position du manipulateur. En application de la norme EN 2469, les fabricants de PSM auront pour obligation de définir la zone du plan de travail où l'on peut manipuler « en sécurité ».
- Proscrire l'emploi d'une source de chaleur dans le PSM (perturbation du flux et altération des filtres).
- Ne pas effectuer de mouvements rapides à l'intérieur du PSM pendant le fonctionnement (perturbation du flux).
- Ne pas entrer et sortir les mains du PSM en cours de manipulation (risque de rupture de la veine de garde).
- Ne pas projeter de liquide ou de solide sur la face du filtre. De même, ne pas accrocher ou suspendre d'objet sur les grilles de soufflage.
- Ne jamais manipuler de produits toxiques mutagènes ou des solvants sous une hotte à flux laminaire vertical (PSM).

Fin de manipulation

- Retirer *tout* le matériel du PSM.
- Laisser le PSM fonctionner en régime de travail au moins 10 minutes avant la mise en régime de veille ou d'arrêt.

Écrire les procédures, les respecter, les évaluer

Protections individuelles

Aucun équipement de laboratoire, aussi performant soit-il, n'est à lui seul un gage de protection absolue. Les comportements individuels peuvent être des facteurs de risque pour lesquels la prévention passe par la formation et l'information du personnel.

Hygiène de base

Il est interdit de boire, manger ou fumer dans le laboratoire. Ces règles sont clairement rappelées dans l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA).

Une tenue remplace les vêtements de ville; elle est spécifique au laboratoire.

Les mains et les poignets sont nus (pas de bagues, faux ongles, montres, bracelets, etc.) pour faciliter l'hygiène des mains par simple lavage au savon doux et désinfection des mains avec une solution hydroalcoolique (SHA).

Gants

Moyen de protection efficace, en particulier contre la transmission cutanéomuqueuse, les gants ne doivent pas devenir une seconde peau. Ils ne doivent être portés que si nécessaire.

Les gants répondent à des normes de fabrication et doivent être adaptés au geste effectué. La protection qu'ils offrent est soit inscrite sur la boîte, soit disponible auprès du fabricant. Les pictogrammes, quant à la protection offerte par les gants, sont rapportés dans la figure 8.9.

Les gants sont à **usage unique** (sauf cas particuliers : gants de ménage, gant de protection contre le froid, l'azote liquide, etc.).

Ils doivent être portés sur des **mains propres** :

- lors de manipulations avec risque de contact avec des liquides biologiques ou un agent biologique;
- lors de la réception et de la manipulation des prélèvements;
- lors de la manipulation de produits chimiques;
- Impérativement en cas de lésions des mains.

Ils doivent être ôtés :

- pour tout acte « propre » : répondre au téléphone, utilisation du clavier d'ordinateur, etc.;
- pour tout contact cutané : visage, lèvres, yeux (lunettes), etc.

Il ne faut pas oublier que les gants deviennent poreux par interaction avec les agents chimiques (par exemple les désinfectants) contenus dans les produits manipulés.

Le choix des gants se fera en fonction du risque évalué et en conformité avec les normes (Fig. 8.9).

De même, un certain nombre de précautions contribuent à faire du port de gants une barrière efficace contre le risque infectieux :

- éviter un étirement excessif des gants lors de l'enfilage;
- ne pas utiliser de crèmes émollientes à base de vaseline ou paraffine avant le port des gants;
- choisir la bonne taille : les gants ne doivent pas être ni trop larges ni trop étroits à la base des doigts ou aux poignets;
- inspecter les gants à l'enfilage pour s'assurer qu'ils ne présentent ni trous ni déchirures;
- ajuster les gants à la base des doigts;

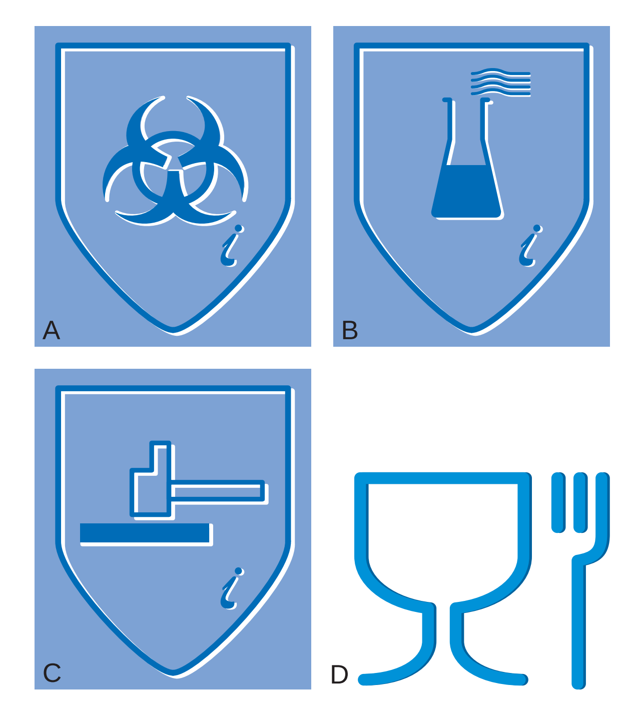


Fig. 8.9 Exemples de pictogrammes utilisés pour les gants. A. Protection contre le risque biologique. **B.** Protection contre le risque chimique. **C.** Protection contre le risque mécanique. **D.** Contact alimentaire possible.

- changer les gants régulièrement entre les différents actes et dès qu'ils sont endommagés;
- réduire le risque de déchirure ou de perforation en gardant les ongles courts et propres, en enlevant tous les bijoux;
- se laver les mains avant et après le port de gants;
- tenir compte de la durée du port des gants (le gant s'altère);
- respecter les indications (protocoles).

Masques et appareils de protection respiratoire (APR)

Les masques constituent un moyen de protection efficace contre la transmission aérienne due aux aérosols, à condition qu'ils soient adaptés et correctement portés. Les masques de soins, qui sont conçus pour éviter la transmission de gouttelettes de salive ou de sécrétions respiratoires du soignant vers le patient, peuvent être utilisés lorsque l'on souhaite protéger la manipulation. Ils ne sont pas adaptés (Fig. 8.10) à la protection du personnel. Il faut choisir des masques conçus pour protéger la personne lors de l'inspiration (Fig. 8.11 et 8.12). Ce sont des appareils de protection respiratoire désignés par la norme EN 149 par le terme de FFP (*filtering facepiece particles*) dont l'efficacité dépend du matériau filtrant, mais aussi de l'étanchéité entre l'APR et le visage (Tableau 8.4). Le choix de l'APR se fait en fonction du risque lié aux agents manipulés et/ou aux manipulations (en particulier risque d'aérosolisation).



Fig. 8.10 Masque médical pour la protection des autres.



Fig. 8.11 Appareil de protection respiratoire pour la protection de celui qui le porte.



Fig. 8.12 Appareil de protection respiratoire «à valve» (protection de celui qui le porte).

Tableau 8.4 Performances des appareils de protection respiratoire.

Désignation du masque	Pénétration du filtre	Fuite totale du masque
FFP1	<20 %	<22 %
FFP2	<6 %	<8 %
FFP3	<0,05 %	<2 %

FFP : *filtering facepiece particles.*

Il n'existe pas de recommandations spécifiques pour les laboratoires, mais pour la manipulation des mycobactéries, un APR équivalent à celui préconisé pour les soins prodigués aux patients tuberculeux paraît constituer un minimum requis, notamment pour la manipulation des tubes de culture lors de leur transport entre les étuves et les postes de sécurité microbiologique. Il conviendra d'utiliser un appareil de protection respiratoire au moins de type FFP2.

Le choix d'un APR à valve limite la gêne respiratoire entraînée par le haut pouvoir filtrant, mais il ne faut pas oublier que la valve s'ouvre à l'expiration et que, de ce fait, l'environnement peut être contaminé par les micro-organismes rejetés avec l'expiration.

Quel que soit le type de masque, pour offrir une réelle protection et éviter que l'air inspiré ne passe par les fuites entre le visage et le masque, celui-ci doit être bien ajusté au visage, ce qui peut être difficile chez les hommes barbus.

Un masque est personnel. Une fois utilisé conformément aux préconisations du fabricant, il doit être éliminé avec les déchets à risque infectieux.

Autres équipements de protection individuelle (EPI)

En fonction du type de manipulation et du mode de transmission des agents biologiques manipulés, d'autres EPI peuvent venir compléter la tenue :

- lunettes de protection pour éviter les projections au niveau de la muqueuse oculaire;
- combinaison étanche pour avoir une protection complète du personnel en cas de projection de liquides.

Gestes de routine

Quels que soient les niveaux de risque et les postes de travail, le respect des règles générales de bonnes pratiques constitue la base de la sécurité au laboratoire. Ces règles commencent par une bonne organisation des locaux qui doivent permettre la distinction formelle des secteurs non exposés (bureaux, zones de repos, etc.) et des secteurs exposés où sont manipulés les produits biologiques et le matériel souillés (pièces techniques, pièce de prélèvements, zone de réception des échantillons, laverie, etc.). La circulation au sein du laboratoire doit être aisée.

Le tableau 8.5 liste quelques règles de base de manipulation des produits pathologiques.

Risques particuliers : biologie moléculaire, organismes génétiquement modifiés (OGM)

La biologie moléculaire connaît de multiples applications tant dans le domaine médical (micro-organismes génétiquement modifiés entre autres) que non médical (agriculture, justice, étude des populations, etc.).

Les manipulations de génie génétique doivent s'accompagner des mesures de confinement correspondantes.

Compte tenu des risques particuliers causés par les OGM, la définition de la Commission de génie génétique (CGG) des niveaux de confinement LI, L2, L3 et L4 (Tableau 8.5) est plus contraignante que celle de l'arrêté de 1996. En particulier, pour minimiser la dissémination d'OGM, l'inactivation des déchets avant élimination est nécessaire dès le niveau L1 de confinement.

Les contraintes correspondant à une classe de confinement donnée comprennent dans tous les cas la totalité des contraintes des classes inférieures.

Toute expérience réalisée dans un laboratoire ayant un type de confinement donné doit se conformer aux pratiques de travail propres à ce laboratoire (même si certaines de ces expériences comportent des risques plus limités).

Un exemplaire des règles à suivre à l'intérieur des locaux L2, L3, L4 doit être affiché à l'entrée de chaque laboratoire.

Lorsque les expérimentations comportent la manipulation d'organismes biologiques pathogènes, les personnes directement impliquées dans la réalisation des expériences doivent être soumises à un traitement prophylactique approprié (vaccination, absorption de substances chimiques, etc.) en accord avec le médecin du travail.

Tableau 8.5 **Présentation schématique de quelques risques associés à des gestes de routine et aux mesures préventives à mettre en œuvre.**

Geste	Exposition au risque, si	Prévention
Réception des prélèvements	Mauvaises conditions de conditionnement et de transport : fuites, bris, etc.	Prévoir des conditionnements adaptés Zone de réception spécifique Tenue adaptée (au minimum des gants) Lavage des mains régulier : prévoir un poste de lavage des mains dans cette zone
Pipetage Rappel : il est proscrit de pipeter à la bouche	Aérosol du fait de présence d'air dans la pipette	Ne pas expulser violemment le liquide hors de la pipette Ne jamais flamber une pipette avec du liquide à l'intérieur (N.B. : l'utilisation d'une flamme est proscrite dans un PSM)
Ouverture de tubes, boîtes de Petri, etc.	L'humidité générée par la culture peut entraîner un aérosol au moment de l'ouverture	Ouvrir impérativement dans la zone sécurisée (poste de travail) ou, mieux, dans l'enceinte de sécurité (PSM II)
Centrifugation	Risque d'aérosol : la vitesse augmente la dispersion d'un aérosol et le rend d'autant plus dangereux Risque de tube cassé	Centrifuger dans des plots parfaitement clos, facilement nettoyables, voire autoclavables S'assurer de l'équilibrage de la centrifugeuse pour éviter le risque de tubes cassés
Homogénéisation, Vortex	Risque d'aérosol	Utiliser des tubes hermétiquement clos (à vis) Laisser reposer avant d'ouvrir Ouvrir avec précautions, si possible dans une enceinte de sécurité (PSM II)
Manipulation des prélèvements solides (biopsie, fragments de pièces chirurgicales, etc.)	Risque de coupures (scalpel, ciseaux, etc.)	Porter des gants Connaître les procédures applicables aux blessures et accidents d'exposition au sang (AES)
Ensemencements, manipulation des cultures	Aérosol Bris de pipette (coupure)	Travailler dans un poste de sécurité (type PSM) Utiliser du petit matériel plastique à usage unique (anses, râteaux, etc.)
Envoi de souches ou de produits biologiques	Détérioration de l'emballage Contamination des « civils »	Emballage conforme aux normes de la classe 6.2 de l'ONU* (Fig. 8.13)

* Réglementation relative au transport par route des matières dangereuses : arrêté du 5 décembre 1996 modifié dit « ADR ».

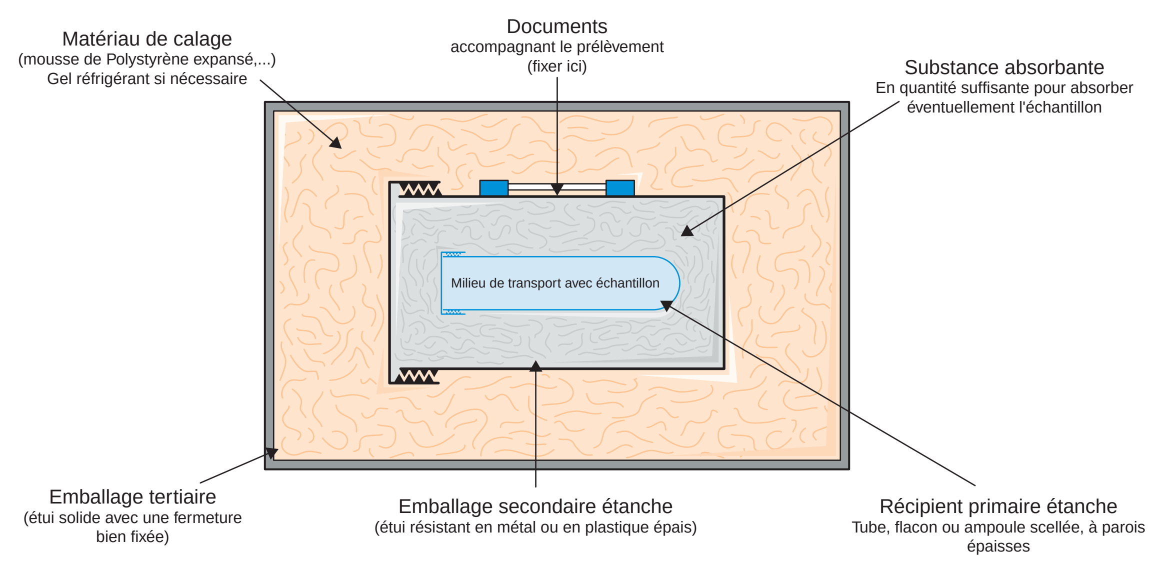


Fig. 8.13 Schéma d'un triple emballage suivant les normes de la classe 6.2 de l'ONU.

Des dispositifs permettant une inactivation immédiate des organismes biologiques manipulés doivent être disponibles dans chaque laboratoire.

Les locaux doivent être maintenus propres et en ordre pour faciliter le respect des bonnes pratiques de travail.

Seule une application intégrale et simultanée de toutes les normes de sécurité appropriées peut permettre une protection réelle des expérimentateurs, de l'environnement et du matériel biologique expérimental.



Fig. 8.14 Symbole graphique du risque biologique (dimensions minimales : 20 mm × 20 mm).

Gestion des déchets

« L'élimination des déchets doit être conforme à la législation et à la réglementation en vigueur. Elle doit être conduite de manière à respecter la réglementation et à ne pas compromettre la santé du personnel du laboratoire ni celui chargé de la collecte des déchets et à ne pas polluer l'environnement » (GBEA, annexe II-6-1).

La loi 75-633 du 15 juillet 1975 modifiée, relative à l'élimination des déchets, rend responsable le producteur de ses déchets tout au long de la filière d'élimination, c'est-à-dire du tri jusqu'au traitement terminal en passant par l'entreposage, la collecte et le transport. Le décret 97-1048 du 6 novembre 1997 confirme ces obligations en les précisant.

Les déchets de laboratoire sont assimilés aux déchets d'activité de soins à risque infectieux (DASRI) et répondent à l'obligation de désinfection ou d'incinération de tous les déchets contaminés. Ils sont soumis à des conditions de transport strictes (arrêté dit ADR) communes à toutes les réglementations pour les transports des marchandises dangereuses (TMD) par chemin de fer, par route ou par voie de navigation intérieure où les matières infectieuses sont classées dans la classe 6-2, suivant la classification à 13 classes de danger. La grande majorité des DASRI y est classée sous le chiffre 4°b (code ONU 3291, déchets d'hôpital non spécifié). Les déchets qui relèvent des groupes de risques 3 et 4 (les mycobactéries tuberculeuses relèvent, rappelons-le, du groupe 3) sont à classer respectivement sous les chiffres 2° et 1° de la classe 6-2, ce qui implique des conditions d'emballage et de transport bien plus contraignantes que pour les déchets classés sous 4°b. Le ministère chargé de la Santé préconise un autoclavage de ces déchets pour diminuer le risque infectieux (sans toutefois le supprimer) et pour classer ces déchets sous 4°b. Lorsque l'emballage est autoclavé avec son contenu, il devra être suremballé dans un emballage conforme aux exigences réglementaires en vigueur pour les matières du 4°b de la classe 6.2, avec en particulier le symbole graphique de « risque biologique » de dimensions extérieures minimales de 20 mm × 20 mm (Fig. 8.14).

Les emballages pour DASRI sont de couleur jaune, étanches, à usage unique et sont soit conformes à la réglementation des transports, soit suremballés dans des récipients conformes à cette réglementation.

Les déchets perforants sont à éliminer dans des conteneurs rigides (norme Afnor NF X30–500, version corrigée avril 2009) même s'ils n'ont pas été mis en contact avec un produit biologique (aiguille, pipette, matériel en verre, flacons, lames, etc.).

Les déchets mous sont à éliminer dans des emballages spécifiques répondant à la norme Afnor X30–501 (décembre 2006). Le compactage est interdit.

L'évacuation des déchets solides se fait par des circuits spécifiques.

Il n'y a pas encore de réglementation pour les effluents liquides de laboratoire.

Les rejets de solvants et de produits toxiques doivent se faire dans des bidons identifiés et évacués par une filière spécifique. De même, les produits mutagènes (diméthyl-

formamide, NBT [nitro blue de tétrazolium], etc.) ou ceux contenant des substances mutagènes (gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium) doivent aussi se faire suivant une procédure spécifique.

La manipulation des produits radioactifs est soumise à une réglementation spécifique (autorisation de détention et d'utilisation de telles substances) et la filière l'élimination de ces déchets est rigoureusement contrôlée.

Conclusion

La sécurité des laboratoires de microbiologie ne peut jamais être totale. De plus, compte tenu du fait qu'au laboratoire les prélèvements à visée diagnostique sont susceptibles de contenir n'importe quel agent infectieux, il est nécessaire d'identifier les risques et les niveaux d'exposition à ces risques à chaque poste de travail pour en déduire une stratégie adaptée au juste besoin de chacun. Cette maîtrise des risques repose sur la réduction voire la suppression de ceux-ci chaque fois que cela est possible et intègre, pour les risques résiduels, les aspects organisationnels et techniques, la prévention médicale et la formation des personnels concernés.

Il est indispensable d'examiner avec un œil critique toutes les étapes de la chaîne allant du prélèvement à l'étude et à la conservation des souches jusqu'à l'évacuation et au traitement des déchets.

Enfin, il ne suffit pas de redoubler d'attention lors de l'installation ou de la mise en place des techniques et d'écrire les procédures; encore faut-il éviter les dérives spontanées insidieuses, parfois dangereuses, en les recherchant lors d'audits réguliers internes ou externes.

Pour en savoir plus

Balty I, Belhanini B, Clermont H, et al. Postes de sécurité microbiologique, postes de sécurité cytotoxique. Choix et utilisation. ND 2201, Cahiers de notes documentaires 2003; 193 : 37–52.
Brendel A. Postes de sécurité microbiologique. Certification et caractéristiques Prévention Infos CNRS 2004; 14 : 1–3.
INRS. Conception des laboratoires d'analyses biologiques. INRS; 2007.
Laboratory Biosafety Manual. Genève : WHO; 2003.
OMS. Manuel de sécurité biologique au laboratoire. In : Organisation Mondiale de la Santé. 3e éd; 2005.
REMIC. Mesures d'hygiène, de sécurité et de sûreté biologique au laboratoire; 2015. p. 385–95.
Sewell DL. Laboratory-associated infections and biosafety. Clin Microbiol Rev 1995; 8 : 389–405.
SFHH. Prévention du risque infectieux dans les laboratoires d'analyses médicales. Hygiènes 2007; 15 : 405–524.
SF2H. Prévention de la transmission croisée par voie respiratoire : air ou gouttelettes. Hygiènes 2013; 21(1).
SFM. Manuel de sécurité et de sureté biologique; 2014.
Texte JC. Précautions d'emploi des postes à flux unidirectionnels. Salles Propres 2003; 28 : 43–4.
Touche S, Fleury L, Berlie C, et al. Risques infectieux dans les laboratoires d'analyses médicales. DMT 2000; 83 : 233–9.
Touche S, Leprince A, Abiteboul D. Maîtrise du risque infectieux en laboratoire de microbiologie. Hygiènes 2002; 10 : 118–31.

Textes réglementaires

Directive 2000/54/CE du Parlement et du Conseil du 18 septembre 2000 concernant les travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents biologiques au travail. Journal Officiel 21-45.CE, L.262 du 17 octobre 2000.
Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.
Arrêté du 30 juillet 2004 relatif à la mise en œuvre, l'importation, l'exportation, la détention, la cession à titre gratuit ou onéreux, l'acquisition et le transport de certains agents responsables de maladies infectieuses, micro-organismes pathogènes et toxine.
Arrêté du 30 avril 2012 modifié par l'arrêté du 6 novembre 2014 fixant la liste des micro-organismes et toxines prévue à l'article L. 5139-1 du Code de la santé publique.
Arrêté du 23 janvier 2013 relatif aux règles de bonnes pratiques tendant à garantir la sécurité et la sureté biologiques mentionnées à l'article R.5139-18 du Code de la santé publique.
Arrêté du 24 avril 2002 portant homologation du règlement relatif aux bonnes pratiques de transport des prélèvements, produits et échantillons issus du sang humain.
Arrêté du 5 décembre 1996 modifié (dit « arrêté ADR ») relatif au transport des marchandises dangereuses par route.
Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.
Arrêté du 7 septembre 1999 relatif au contrôle des filières d'élimination des déchets d'activité de soins à risque infectieux et assimilés et des pièces anatomiques.
Arrêté du 6 janvier 2006 modifiant l'arrêté du 24 novembre 2003 relatif aux emballages des déchets d'activités de soins à risques infectieux et assimilés et des pièces anatomiques d'origine humaine.
Guide technique : élimination des déchets d'activités de soins à risques. Ministère de l'Emploi et de la Solidarité; 1999.
Décret 97-1048 du 6 novembre 1997 relatif à l'élimination des déchets d'activité des soins à risque infectieux et assimilés et des pièces anatomiques et modifiant le Code de la santé publique.
Arrêté du du 30 juin 1998 modifiant l'arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste des agents biologiques pathogènes.
Circulaire DH/S 12 DGS/VS3 n° 554 du 1er septembre 1998 concernant la collecte des objets piquants, tranchants souillés.
Décret n° 2010-736 du 30 juin 2010 relatif aux micro-organismes et toxines.
Arrêté du 30 juin 2010 fixant les renseignements qui figurent dans le registre ou les enregistrements mentionnés à l'article R.5139-17 du Code de la santé publique, notamment les modalités de leur tenue et les informations qu'ils contiennent.
Arrêté du 30 juin 2010 fixant les renseignements qui figurent sur l'autorisation mentionnée à l'article R.5139-1 du Code de la santé publique.
Arrêté du 30 juin 2010 fixant les mentions qui figurent sur les états annuels des stocks prévus à l'article R.5139-14 du Code de la santé publique.
Décision du 20 octobre 2010 fixant le contenu du dossier technique mentionné à l'article R.5139-3 et accompagnant la demande d'autorisation prévue à l'article R.5139-1 du Code de la santé publique.

L'accréditation au laboratoire de bactériologie

N. Hidri, L. Essemilaire, F. Guérin

PLAN DU CHAPITRE

Introduction

La qualité est définie comme « l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'une entité (produit, service, activité, organisme, système, personne, etc.) conférant l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites » [1].

La qualité est un concept qui a émergé avant la Deuxième guerre mondiale avec Taylor, Shewhart, Deming et Juran. En 1926 est créée l'Agence française de normalisation (AFNOR), en 1987 apparaissent les normes ISO (*International Organization for Standardization*).

En biologie médicale, un contrôle de qualité national est instauré en 1978 « pour assurer la fiabilité et le perfectionnement des analyses de biologie médicale dans l'intérêt général de la santé publique et permettre à chaque laboratoire de vérifier la valeur de ses techniques et son bon fonctionnement ».

Dans cet extrait, on retrouve des points essentiels de la démarche d'accréditation : qualité des résultats, amélioration continue des prestations, évaluation de la maîtrise des méthodes par le laboratoire (maîtrise des 5M [voir plus loin]), satisfaction des besoins des clients.

Un arrêté rendit obligatoire en 1994 le Guide de bonne exécution des analyses (GBEA), qui fut révisé en 1999.

Une réforme de la biologie médicale est engagée en 2007 et a pour objectif de « permettre à chacun d'avoir accès à une biologie médicale de qualité prouvée, payée à son juste prix, dans un contexte européen ».

Le diplôme de biologiste est nécessaire mais pas suffisant ; on aborde ici une autre notion essentielle d'un système qualité : toujours être en mesure d'apporter la preuve que l'on met en œuvre les règles de bonnes pratiques, comme le passage de contrôles de qualité, le respect des conditions de stockage et de péremption des produits, le respect des conditions de fonctionnement des automates, l'évaluation des compétences du personnel, etc.

L'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) par le Comité français d'accréditation (COFRAC) selon la norme NF EN ISO 15189 est devenue une obligation réglementaire depuis la parution de l'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.

Une seule accréditation est délivrée pour l'ensemble des sites du LBM, quel que soit le nombre de sites (COFRAC SH REF 02). Elle porte sur la totalité des activités du LBM : de la phase préanalytique à la phase postanalytique.

L'accréditation permet une reconnaissance de l'organisation et de la compétence de l'organisme (exigences de management et exigences techniques de la NF EN ISO 15189). Elle est fondée sur une évaluation des pratiques par les pairs avec le soutien de qualiticiens, l'objectif étant de garantir la fiabilité des examens de biologie médicale et la qualité de la prestation médicale offerte.

Elle doit être effective le 1er novembre 2016 pour l'ensemble des LBM, avec accréditation de 50 % de l'activité analytique. Ensuite, l'échéance est fixée au 1er novembre 2018 avec 70 % d'activité accréditée, puis au 1er novembre 2020 avec 100 % (arrêté du 17 octobre 2012 et loi 2013-442 du 30 mai 2013 ; l'arrêté du 23 février 2015 précise les conditions d'entrée).

Une nouvelle version de la norme NF EN ISO 15189 de décembre 2012 ne comporte pas de modification majeure mais propose une présentation améliorée du contenu pour en faciliter l'application, une démarche par processus et l'intégration des exigences liées au système d'information (COFRAC SH INF 21).

Le chapitre 4 de la norme NF EN ISO 15189 décrit l'organisation, l'ensemble des responsabilités et des moyens nécessaires pour mettre en œuvre une politique qualité.

Le chapitre 5 décrit les exigences techniques, en incluant le personnel, les locaux, les étapes préanalytique, analytique et postanalytique, la garantie des résultats, et le système de gestion des informations.

Pour les LBM déjà accrédités selon la version 2007, une période transitoire a été instaurée. Une évaluation du LBM par le COFRAC selon la version 2012 qui devait être effective avant le 31 octobre 2015 pour éviter la suspension d'accréditation au 1er mars 2016.

Définitions

Accréditation : Procédure selon laquelle un organisme tierce partie faisant autorité (COFRAC) fournit une reconnaissance formelle de la compétence d'une personne ou d'un organisme à réaliser des activités spécifiées d'évaluation de conformité (COFRAC SH GTA 01).
Ou : Reconnaissance de la conformité de l'organisation d'un laboratoire et de sa compétence par un organisme accréditeur (la certification ne reconnaît que l'organisation).

Action corrective : Action visant à éliminer la cause d'une non-conformité, pour éviter sa réapparition (ISO 9000).

Action immédiate : Action visant à traiter une non-conformité détectée (ISO 9000). Synonyme d'action curative ou action curatrice.

Action préventive : Action visant à éliminer la cause d'une non-conformité potentielle ou d'une autre situation potentielle indésirable détectée (ISO 9000).

Analyse : En biologie médicale, correspond à la phase analytique de l'examen de biologie médicale (COFRAC SH GTA 01).

Approche processus : Toute activité ou tout ensemble d'activités utilisant des ressources (matérielles, humaines) permettant la transformation d'éléments d'entrée en éléments de sortie avec une valeur ajoutée peut être considéré(e) comme un processus. L'élément de sortie d'un processus constitue souvent l'élément d'entrée du processus suivant. La représentation graphique de ces différents processus s'appelle une cartographie des processus (COFRAC SH GTA 01).

Audit : Processus méthodique, indépendant et documenté, permettant d'obtenir des preuves (enregistrements, etc.) et de les évaluer de manière objective pour déterminer dans quelle mesure l'ensemble des politiques, procédures ou exigences est satisfait (ISO 9000). Ce terme doit être abandonné pour « évaluation ».

Comparaison interlaboratoire (CIL) : Organisation, exécution et évaluation des mesures ou des essais réalisés sur des éléments identiques ou similaires par au moins deux laboratoires en fonction de conditions déterminées (COFRAC SH GTA 01).

Compétence : Capacité démontrée à appliquer des connaissances et savoir-faire (NF EN ISO 15189).

Contrôle de qualité (CQ) : L'action de mesurer, d'examiner, d'essayer une ou plusieurs caractéristiques et de les comparer aux exigences spécifiées en vue d'établir leur conformité et, sinon, de mettre en évidence des défauts et de déclencher des actions correctives (AFNOR 1992).

Écart : Différence entre une situation attendue et une situation observée, dans le cadre de l'examen de la prise en compte des exigences d'accréditation.

Écart critique : Écart dont le résultat met en cause la fiabilité des résultats ou l'aptitude du système de management à maintenir le niveau de qualité des examens. L'écart peut avoir un effet avéré et quantifiable par l'évaluateur, ou peut présenter un risque théorique fort que le laboratoire doit évaluer en pratique et prendre en compte pour confirmer la qualité de ses résultats.

Écart non critique : Écart dont le résultat n'affecte pas ou n'est pas susceptible d'affecter directement et immédiatement la qualité des examens.

Examen de biologie médicale : Un examen de biologie médicale est un acte médical qui concourt à la prévention, au dépistage, au diagnostic ou à l'évaluation du risque de survenue d'états pathologiques, à la décision et à la prise en charge thérapeutiques, à la détermination ou au suivi de l'état physiologique ou physiopathologique de l'être humain (COFRAC SH GTA 01).

Guide technique d'accréditation (GTA) : Document formulant des recommandations du COFRAC à destination des différentes parties intéressées pour l'évaluation et l'accréditation. Ce document ne comporte pas d'élément opposable.

Habilitation : Autorisation d'exécuter (des tâches, des actions, etc.). *Note :* la qualification, l'attribution ou la reconnaissance de compétence ou d'une aptitude (à exécuter des tâches, des actions, etc.) est à différencier de l'habilitation et constitue une condition de l'habilitation (COFRAC SH REF 02).

Interprétation : Elle consiste à indiquer la signification biologique d'un ou de plusieurs résultats, pris individuellement ou dans leur ensemble, en fonction des éléments cliniques pertinents (COFRAC SH REF 02).

Laboratoire de biologie médicale (LBM) (article L.6212-1 du Code de la santé publique) : Structure, privée ou publique, au sein de laquelle sont effectués les examens de biologie médicale. Le LBM est constitué d'un ou de plusieurs sites. Le LBM peut également réaliser des activités biologiques d'assistance médicale à la procréation ainsi que des examens d'anatomie et de cytologie pathologiques. *Note :* sur chaque site peut être réalisé soit le recueil d'éléments cliniques pertinents, le prélèvement d'un échantillon biologique, la validation et l'interprétation contextuelle du résultat ainsi que sa communication appropriée au patient; soit les activités analytiques (plateau technique); soit ces deux types d'activités.

Manuel d'assurance qualité (MAQ) : Document interne qui définit la politique qualité du laboratoire de biologie médicale ou de la structure et qui décrit le système de management de la qualité.

Non-conformité : Non-satisfaction d'une exigence. Un événement est classé comme une non-conformité quand il s'écarte d'une politique, d'un processus ou d'une procédure du laboratoire et ne satisfait donc pas une des exigences du manuel qualité ou des contrats avec des clients

(patients, prescripteurs, autres laboratoires) (ISO 9000).

Portée d'accréditation : Énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le laboratoire demande une accréditation ou est accrédité (NF EN ISO 15189). *Note :* elle résulte d'un ensemble d'informations (paramètres de la portée), comprenant (voir SH REF 08 et SH INF 50) : la nature des domaines/sous-domaines/familles; la nature des échantillons biologiques; les types d'examens; les descriptions des principes de méthodes; les références des méthodes et procédures employées.

Processus : Ensemble d'activités corrélées ou interactives qui transforment des éléments d'entrée en éléments de sortie. Les éléments d'entrée d'un processus sont généralement les éléments de sortie d'autres processus (NF EN ISO 15189).

Processus ou phase analytique : Étapes d'analyse à proprement parler, débutant sur tout ou partie de l'échantillon biologique (aliquote), comprenant une préparation éventuelle du spécimen (prétraitement, réaction chimique, incubation, coloration en hématocytologie, etc.) jusqu'à l'obtention d'un résultat d'analyse (mesure, identification, lecture, etc.), généralement à l'aide d'un instrument de mesure analytique (COFRAC SH GTA 01).

Processus ou phase postanalytique : Toutes les étapes qui suivent l'obtention du résultat de l'analyse (examen), comprenant le transfert des données, la revue systématique, la mise en forme et l'interprétation, la validation, le compte rendu et la transmission des résultats et le stockage des échantillons biologiques examinés (COFRAC SH GTA 01).

Processus ou phase préanalytique : Série d'étapes avant analyse, comprenant la demande d'analyse, la préparation du patient, le prélèvement du spécimen/échantillon biologique humain, son acheminement et sa conservation jusqu'au site de la phase analytique (voire au sein du site analytique) et finissant au début de la phase analytique. Dans le cas d'un examen de biologie médicale, cette phase comprend aussi le recueil des éléments cliniques pertinents (COFRAC SH GTA 01).

Qualité : Aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences (ISO 9000:2000)

Spécimen : Pour éviter une confusion avec le terme « échantillon » (au sens : groupe d'individus extrait d'une population), il est préféré le terme « spécimen » pour désigner une ou plusieurs parties issues d'un prélèvement biologique (spécimen de sang, spécimen urinaire, etc.). Correspond à l'échantillon biologique au sens du Code de santé publique (COFRAC SH GTA 01).

Système de management de la qualité (SMQ) : Système de management permettant d'orienter et de contrôler un organisme, c'est-à-dire permettant d'établir une politique et des objectifs en matière de qualité et de les atteindre (l'ISO 9000:2005).

Validation : Confirmation par des preuves objectives que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites (NF EN ISO 15189).

Vérification : Confirmation par des preuves tangibles que les exigences spécifiées ont été satisfaites (NF EN ISO 15189).

Comité français d'accréditation (COFRAC)

Cet organisme a été créé en 1994, avec un statut d'association loi 1901.

Quatre mots clé définissent ses missions : compétence, indépendance (association loi 1901), impartialité (instances comportant trois collèges, organismes accrédités, leurs clients et les représentants d'intérêts publics) et confidentialité.

Une section santé humaine a été créée en 2010, suite à la parution de l'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale. Tout document émis par cette section est identifié par SH.

Un organisme est accrédité pour une activité; il doit donc définir la portée de son accréditation (COFRAC SH INF 50).

Toute demande d'accréditation au COFRAC doit comporter la référence de la norme choisie (NF EN ISO 15189 : décembre 2012), la portée d'accréditation, les dossiers de validation des méthodes, le manuel d'assurance qualité (MAQ), le questionnaire de renseignements (COFRAC SH FORM 05), le questionnaire d'autoévaluation (COFRAC SH FORM 03).

Une convention d'accréditation est élaborée entre le LBM demandeur et le COFRAC.

Les différentes étapes sont schématisées dans le logigramme récapitulatif des étapes du traitement d'une demande d'accréditation, présenté dans le document COFRAC SH INF 20 (Fig. 9.1).

Lors de l'évaluation d'accréditation, l'évaluateur s'engage à agir en toute indépendance et impartialité. Il a pour mission l'examen :

- des dispositions organisationnelles et techniques et leur application (enregistrements, traçabilité, etc.);
- des compétences du personnel réalisant les activités du LBM (observation de tout ou partie d'un examen, entretiens, etc.);
- des résultats des contrôles de qualité : contrôle interne de qualité (CIQ), comparaison interlaboratoire (CIL) ou évaluations externes de la qualité (EEQ), etc.;
- du recueil effectif des renseignements cliniques (phase préanalytique);
- de la communication des résultats interprétés.

L'évaluation sur site n'est pas une inspection. Le biologiste responsable du LBM a la possibilité de faire part de ses commentaires en fin d'évaluation et de contester les constats proposés par l'évaluateur COFRAC (COFRAC SH REF 02).

Suite à l'accréditation initiale, des évaluations régulières sont programmées : évaluation de renouvellement tous les 4 ou 5 ans, et évaluation de surveillance tous les 12 ou 15 mois (Fig. 9.2).

Il est à noter qu'un organisme accrédité ne sera pas audité par la Haute autorité de santé (HAS) dans le cadre de la certification, l'accréditation étant la reconnaissance de sa compétence.

Pour l'accréditation, les documents suivants sont opposables :

- la norme NF EN ISO 15189 : décembre 2012;
- les référentiels (« REF ») du COFRAC :

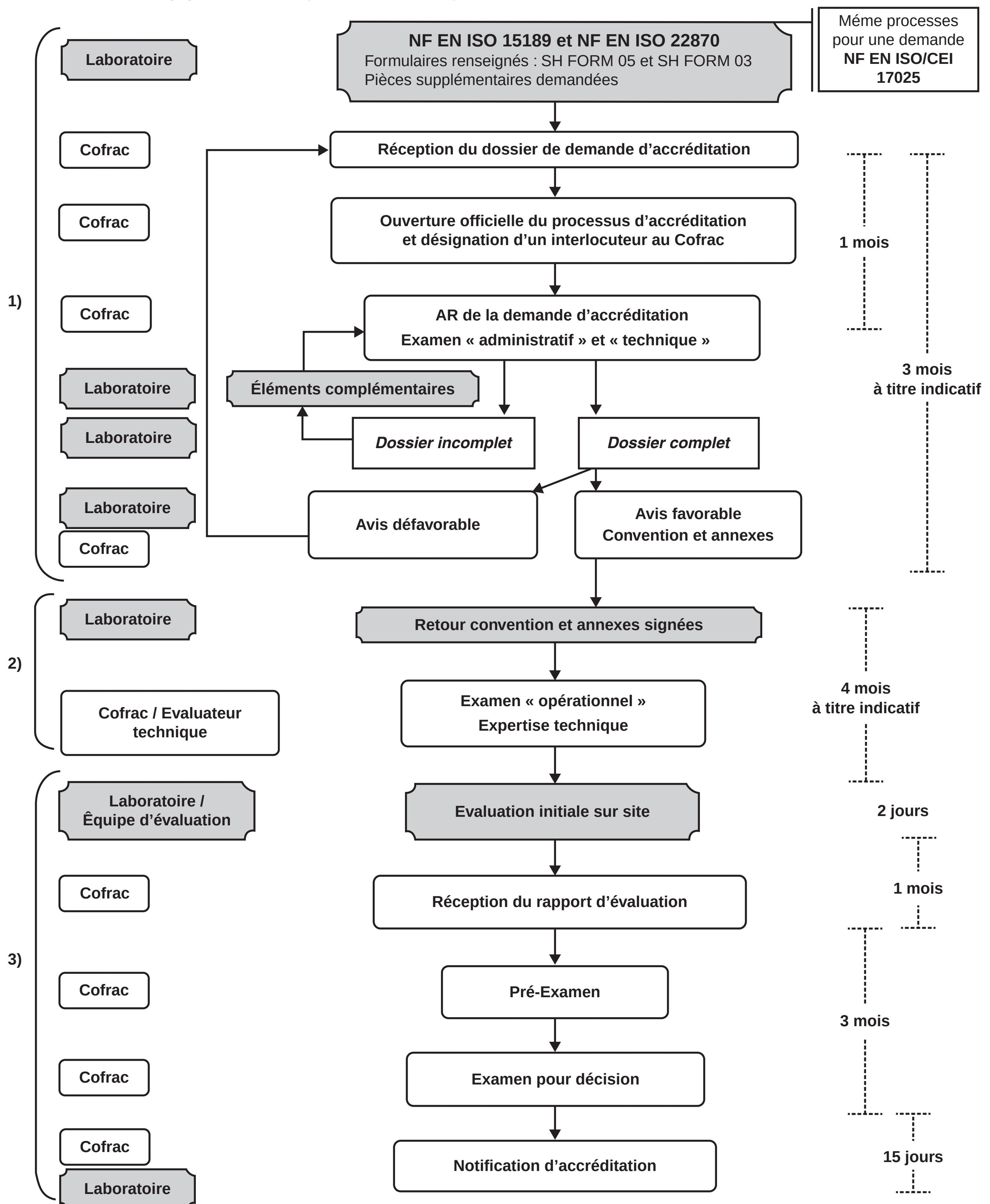


Fig. 9.1 **Extrait du COFRAC SH INF 20 : Logigramme récapitulatif des étapes du traitement d'une demande d'accréditation.**

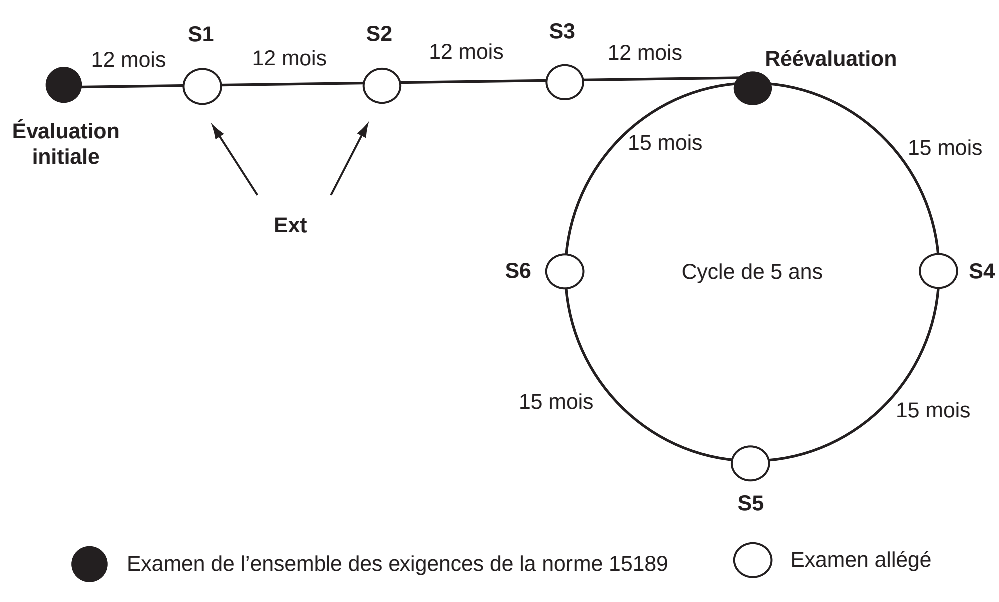


Fig. 9.2 Schéma synthétisant la périodicité des évaluations avec les évaluations de renouvellement et les évaluations de surveillance.



Fig. 9.3 Logos utilisés dans le SH REF 02.

- le COFRAC SH REF 02 est un recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des LBM. Il a pour objet de préciser les exigences organisationnelles et techniques générales nécessaires et suffisantes pour la réalisation d'examens de biologie médicale. Les dispositions législatives et réglementaires concernant la qualité des pratiques en biologie médicale sont explicitement citées. Leur non-respect constitue un écart. Au sein de chaque chapitre, des logos (Fig. 9.3) indiquent le caractère réglementaire, les exigences normatives et les notes ;
- le COFRAC SH REF 08 présente le mode d'expression de la portée d'accréditation des structures, en fonction de la modularité attendue par elles, et leurs modalités d'évaluation par le COFRAC ;
- le COFRAC SH REF 04 est constitué d'une compilation de notes présentées sous forme de fiches individualisées par sujet. La définition de chaque note a fait l'objet d'un processus de consultation et de décision qui s'est appuyé largement sur le comité de la section santé humaine du COFRAC.

Des documents d'information (« INF ») complètent la documentation disponible auprès du COFRAC :

- COFRAC SH INF 20 : modalités de candidature à l'accréditation par la section santé humaine du COFRAC ;
- COFRAC SH INF 21 : résumé des principales différences entre les versions 2007 et 2012 de la norme NF EN ISO 15189 ;
- COFRAC SH INF 50 : portées type d'accréditation.

Des guides techniques d'accréditation (GTA) recommandent aux LBM et autres structures des précisions suffisantes pour répondre aux exigences des normes sur des sujets techniques particuliers. Les recommandations des GTA ne sont pas opposables mais contiennent des recommandations utiles pour la mise en place des exigences au sein du laboratoire, fruit de la réflexion collégiale de biologistes médicaux publics et privés et de membres des instances de la section santé humaine du COFRAC.

Le LBM est libre d'appliquer ces recommandations, reconnues par le COFRAC comme étant les plus appropriées pour répondre aux exigences ; toute autre démarche argumentée et documentée est cependant acceptable.

La plupart de la documentation COFRAC est disponible sur son site internet (www.cofrac.fr).

QUAMIC (Groupe QUAlité Microbiologie)

Dans une démarche initiée par la Société française de microbiologie (SFM), une trentaine de microbiologistes médicaux d'établissements publics ou privés, universitaires ou non, ont rédigé un référentiel spécifique à la microbiologie qui fixe le niveau d'exigences et de compétences requis pour l'activité professionnelle dans les domaines pré-analytique, analytique et postanalytique. Il sera revu régulièrement au fil des évolutions des exigences, de l'évolution des techniques et des besoins.

Il sera également enrichi de chapitres concernant plus spécifiquement les spécialités de virologie et mycologie.

Chapitre 4 de la norme : le système de management de la qualité

L'assurance qualité repose sur la mise en place d'un système de management de la qualité (SMQ). La direction du LBM doit être fortement engagée et impliquée dans le projet d'accréditation ; elle doit définir l'objectif de son SMQ dans une politique qualité qui doit être adaptée à l'organisme.

Elle doit comprendre à minima l'engagement à respecter les bonnes pratiques professionnelles et les exigences de la norme NF EN ISO 15189, à améliorer en permanence la qualité des prestations.

La direction doit définir des objectifs « qualité » mesurables et cohérents avec la politique qualité. Le SMQ doit être unique et harmonisé dans le cadre d'un LBM multisites hospitalier ou privé.

Le LBM doit s'assurer qu'il y a une cohérence entre la politique, les objectifs et les indicateurs permettant de suivre ces objectifs. L'évaluateur COFRAC vérifiera l'adéquation des indicateurs définis avec la politique et les objectifs « qualité » (NF EN ISO 15189 : décembre 2012, chapitre 4.14.7).

Le LBM doit définir des indicateurs qualité pertinents pour surveiller la performance des différents processus, notamment les aspects critiques des processus préanalytiques, analytiques et postanalytiques.

Il doit évaluer périodiquement le délai de rendu des résultats afin de s'assurer qu'il correspond aux besoins des cliniciens et à la qualité des soins prodigués aux patients.

Les acteurs – autorités et responsabilités

Les responsabilités et autorités du personnel doivent être définies, documentées et communiquées au sein du laboratoire.

Un organigramme fonctionnel et/ou hiérarchique du laboratoire doit être formalisé. Il doit être complété par des fiches de fonctions (ou définitions de fonctions) qui présentent les tâches et les responsabilités attribuées à chaque fonction identifiée sur l'organigramme. Des suppléances doivent être prévues pour les fonctions clés afin de garantir la continuité des prestations.

Le responsable qualité nommé par la direction est le garant de la conformité du SMQ aux exigences de la norme et à la politique qualité. Le responsable technique s'assure des dispositions techniques pour les activités concernées et de leur bonne application.

Communication

De nombreux conflits ou non-conformités sont liés à des défauts de communication. La direction doit prévoir des moyens efficaces pour communiquer avec le personnel en interne, mais également avec les clients en externe. Des enregistrements doivent être conservés (réunions, notes de service, affichage, courriels, etc.).

Management par approche processus

Le SMQ doit mettre en œuvre les recommandations de la norme NF EN ISO 15189, version 2012, qui impose un management par approche processus. Celui-ci permet de faciliter le pilotage et la surveillance du SMQ par la cellule qualité, via des revues de processus et des indicateurs. Il permet à chacun de se positionner dans l'organisation, de comprendre que l'on est tous dépendants les uns des autres, tous clients les uns des autres au sein de l'organisation (notion de client interne).

La cartographie des processus présente les différents processus définis au sein du LBM, leur séquence et interactions. Elle permet d'avoir une vision globale des principales activités à gérer et à maîtriser (Fig. 9.4).

Chaque processus peut être considéré selon une démarche qualité, avec un pilote de processus, une formalisation selon la méthode des 5M (Matériel, Moyen, Méthodes, Milieu, Main-d'œuvre), une gestion documentaire propre, des indicateurs qualité et une traçabilité des dysfonctionnements.

Gestion des non-conformités et amélioration continue

Cette amélioration continue peut être illustrée par la roue dite de Deming (Fig. 9.5). Quatre étapes structurent toute action de qualité : une planification est l'étape première avant la réalisation. Ensuite, l'étape d'évaluation permet d'atteindre l'étape des ajustements nécessaires. Ces étapes sont coordonnées par le SMQ.

Un système de recueil des dysfonctionnements et des non-conformités doit être mis en place et identifié dans une procédure.

Les analyses ou activités non conformes dans tous les processus du LBM doivent être identifiées et enregistrées, y compris les réclamations des clients. Les dysfonctionnements peuvent être constatés au quotidien, lors des audits, des revues de processus, des évaluations de compétence, des comptes-rendus d'EEQ, de la revue de direction, des enquêtes de satisfaction clients ou des suggestions du personnel, etc.

La revue des non-conformités doit être effectuée régulièrement afin d'ouvrir les actions nécessaires à l'amélioration du SMQ, après avoir réalisé une analyse de l'étendue et des causes profondes des anomalies constatées.

Les actions d'amélioration décidées par le LBM doivent être communiquées en interne, suivies dans le temps et clôturées uniquement après vérification de leur efficacité.

CARTOGRAPHIE DES PROCESSUS

EXIGENCES et BESOINS

Patients

Prescripteurs

Établissements de soins

Correspondants (infirmière, etc.)

Organismes payeurs (CPAM, mutuelles, etc.)

Organismes de tutelle (ARS, Ordres, etc.)

Organismes d'accréditation (COFRAC)

Politique qualité
Responsabilités et engagement de la direction
Confidentialité et éthique
4.1 / 4.2

Gestion de la communication (interne, externe)
4.1

Évaluation et amélioration de la qualité
Gestion des risques
4.8 / 4.9 / 4.10 / 4.11 / 4.12 / 4.14 / 4.15

PROCESSUS DE MANAGEMENT (Stratégie - Pilotage)

Prestations de Conseil
4.7

Pré-analytique
– Traitement des demandes d'examens / réception
– Prélèvements
– Transport des échantillons
– Pré-traitement / Sous-traitance / Sérothèque - Biothèque
4.4 / 4.5 / 5.2 / 5.4

Analytique
– Vérification des méthodes
– Gestion des automates
– Gestion des calibrations / CIQ
– Réalisation des analyses
– Gestion des résultats patients

Post-analytique
– Validation biologique
– Gestion des résultats alertes
– Gestion du compte-rendu
– Facturation
5.7 / 5.8 / 5.9

PROCESSUS DE REALISATION (Métiers - Opérationnels)

Gestion des documents et des enregistrements
4.3 / 4.13

Gestion des achats et des stocks
Réactovigilance
4.6 / 5.2 / 5.3

Gestion des systémes informatiques
5.2 / 5.10

Gestion des ressources humaines
5.1

Matériel et Métrologie
5.3

Gestion de l'hygiène, de la sécuritè, de l'environnement
5.2

PROCESSUS SUPPORT

SATISFACTION

Clients et correspondant

Autres organismes

Fig. 9.4 Exemple de cartographie de processus pour un laboratoire de biologie médicale.

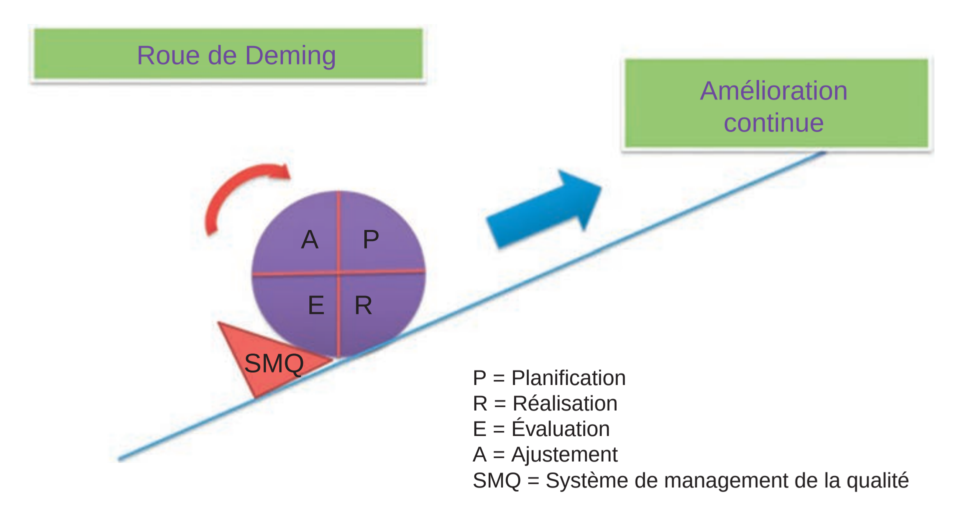


Fig. 9.5 Schématisation d'une action qualité selon le concept de la roue de Deming.

La déclaration de ces non-conformités ne doit pas être accusatrice ou ressentie comme une délation ; elle n'a pas vocation à sanctionner des fautes mais à améliorer le SMQ.

Gestion des risques – analyses de tendance et actions préventives

Des analyses de risques, élément essentiel de la version 2012 de la norme ISO 15189, doivent être formalisées a minima pour les processus métiers préanalytiques, analytiques et postanalytiques.

Le LBM doit engager une réflexion sur les causes profondes des non-conformités potentielles dans les différents processus afin de lister les points critiques, de vérifier si les modalités de maîtrise déjà prévues sont suffisantes, d'ouvrir des actions préventives éventuelles pour tout risque non maîtrisé.

Les actions préventives relèvent d'un processus d'anticipation permettant d'identifier des possibilités d'amélioration du SMQ.

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour documenter la gestion des risques et éventuellement coter les risques identifiés : 5M, AMDEC (analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité), Marion, etc.

Cet exercice doit être systématiquement réalisé et formalisé dans les dossiers de vérification de méthodes, qualitatives ou quantitatives (COFRAC SH GTA 04 et COFRAC SH FORM 43).

Une procédure de gestion de portée flexible (ou de maîtrise des changements de méthodes) doit être formalisée pour décrire toutes les vérifications que le LBM va effectuer avant de déclarer une nouvelle méthode apte à l'utilisation en routine (ajout dans la portée ou changement de méthode d'une analyse déjà accréditée par exemple). Il s'agit en fait d'une action préventive de vérification de la conformité des différents processus du LBM pour la nouvelle méthode.

Il est recommandé de prévoir un formulaire d'enregistrement pour tracer les différentes vérifications réalisées, preuve de la bonne application de la procédure de gestion de portée flexible du LBM.

Gestion documentaire

La gestion documentaire est sous la responsabilité du responsable de l'amélioration de la qualité.

Une procédure de gestion documentaire doit préciser les modalités pour la maîtrise de la documentation qualité, sa communication, ses révisions et modifications, son archivage, etc. Cette gestion peut être facilitée avec un logiciel de gestion documentaire.

Le manuel d'assurance qualité (MAQ) doit présenter le LBM, l'engagement de la direction, l'organisation du SMQ, les politiques, les exigences et objectifs qualité pour la prise en charge des échantillons, les performances analytiques, le retour des résultats, la gestion des non-conformités, la revue de contrat, le traitement des réclamations, la structure documentaire.

La revue des documents doit être entreprise à l'occasion de chaque modification ou de façon régulière, au minimum tous les 2 ans.

La gestion documentaire peut être représentée de manière simplifiée (Fig. 9.6).

La finalité du processus de gestion documentaire est de mettre à disposition de l'ensemble du personnel les documents nécessaires applicables pour la réalisation des différentes activités (managériales et techniques). Il faut conserver en dehors du poste de travail les documents obsolètes, pour éviter toute utilisation malencontreuse.

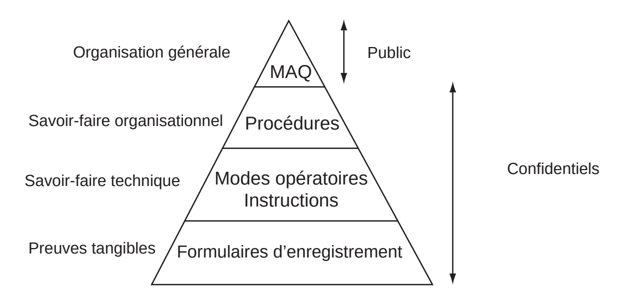


Fig. 9.6 Schématisation d'une architecture documentaire.

La documentation du LBM est mixte (interne et externe). Les dispositions définies pour la gestion documentaire doivent garantir que toutes les procédures sont documentées, approuvées pour leur utilisation en interne, connues et comprises des utilisateurs, qu'il s'agisse de procédures et de modes opératoires internes ou de fiches techniques externes.

Les produits utilisés en bactériologie sont nombreux (milieux de cultures, disques ou galeries d'identification et d'antibiogramme, réactifs annexes, etc.). Le LBM doit donc assurer une veille documentaire rigoureuse des versions des fiches techniques, évaluer l'impact de toute modification de version, et réviser, si besoin, les procédures du LBM pour garantir une application conforme de la méthode.

La documentation externe comprend la gestion des fiches techniques fournisseur mais également les recommandations de bonne pratique (Rémic, QUAMIC, CA-SFM, etc.) et les documents opposables du COFRAC.

Enregistrements, traçabilité, mémoire du laboratoire de biologie médicale

Les enregistrements contiennent des informations à partir d'une date précise indiquant les résultats obtenus ou apportant la preuve des activités réalisées et sont tenus à jour (NF EN ISO 15189).

Le LBM doit conserver tous les éléments de preuve de la bonne réalisation des activités dans tous les processus conformément à la réglementation et pendant au moins 18 mois, en ce qui concerne l'accréditation (format papier ou électronique). On peut citer par exemple : habilitation et maintien des compétences du personnel, données brutes des CIQ et des patients, résultats et exploitation des EEQ, certificats d'étalonnage du matériel soumis à métrologie, comptes-rendus d'examens et traçabilité des opérateurs, numéros de lots des produits utilisés, essais d'acceptation des réactifs et consommables avant utilisation, etc.

En évaluation COFRAC, des tests de traçabilité sont systématiquement réalisés par les évaluateurs afin de vérifier la bonne application des dispositions prévues par le LBM et la bonne conservation des enregistrements.

Les enregistrements doivent être aisément accessibles et protégés contre toute modification non autorisée.

En cas de conservation sous format électronique, les données stockées doivent pouvoir être lues pendant toute la période de conservation, même en cas de changement d'automate ou de logiciel (système informatique de laboratoire [SIL], données brutes automates, changement *middleware*). Cela implique de maintenir des logiciels pendant toute cette durée alors qu'ils ne sont plus utilisés en routine.

Indicateurs

En principe, à tout processus correspond un indicateur. Il permet de connaître à tout moment la valeur ajoutée du laboratoire.

Il existe plusieurs types d'indicateurs : de structure, de processus, de résultat, de satisfaction du personnel, sentinelle, etc.

L'indicateur de qualité doit être SMART :

- *s*imple, car facile à établir et à collecter ;
- *m*esurable ;

- *a*ccepté : la provenance des données doit être transparente pour que l'indicateur soit accepté par tous. Il doit permettre de sensibiliser le personnel et de l'impliquer dans la démarche qualité ;
- *r*éaliste car pertinent, précis et fiable ;
- *t*emporel : l'intérêt d'un indicateur réside dans sa capacité à durer dans le temps. La donnée analytique doit donc revêtir un caractère stable.

Ces indicateurs doivent être revus et analysés périodiquement.

Les indicateurs possibles sont les non-conformités préanalytiques, le non-respect du délai de rendu des examens urgents, le nombre de CIQ ou de CIL non conformes, le nombre de commandes de réactifs en urgence, etc.

Audits internes

L'objectif est de vérifier que toutes les activités du LBM sont conformes aux exigences normatives et aux exigences définies par le LBM.

Les audits internes peuvent être réalisés par du personnel interne qualifié et habilité ou par des auditeurs externes. Les auditeurs doivent être formés à la méthodologie de l'audit, compétents dans le domaine audité, objectifs et indépendants de l'activité à auditer.

L'ensemble des activités du LBM (pour tous les sites et sur l'intégralité de la norme) doit faire l'objet d'audits internes ; un intervalle de 12 mois entre chaque audit est recommandé.

Contrats de prestation

Les besoins des clients doivent être identifiés par les biologistes. Les contrats doivent être formalisés, mentionnant les exigences et engagements des deux parties, notamment pour le LBM, les conditions préanalytiques, les renseignements cliniques, l'acheminement avec délais et fréquence, les méthodes utilisées, les analyses réalisées ou sous-traitées, les modalités et rendus des résultats, les interprétations particulières, les modalités de conservation ou de restitution des échantillons analysés.

Une revue de contrat doit permettre de vérifier que les engagements sont respectés, mais aussi que le LBM peut répondre aux besoins implicites du prescripteur et du patient.

L'acceptation de la demande d'examen peut valoir revue de contrat, pourvu que le LBM ait défini dans ses dispositions les items et modalités de cette acceptation (COFRAC SH REF 02).

La satisfaction du client doit être évaluée par des enquêtes régulières de satisfaction.

Revue de direction

Incontournable dans la vie d'un SMQ, organisme vivant qu'il faut adapter, orienter en fonction du contexte et des données disponibles, la revue de direction doit comporter le suivi des revues de direction précédentes, l'avancement des actions correctives menées et des actions préventives requises, les résultats des CIL, les résultats des indicateurs de fonctionnement des processus et des audits, l'évaluation des fournisseurs, les suggestions du personnel, la gestion des risques, la pertinence des procédures, etc.

Les conclusions et les mesures qui en résultent (avec le délai de réalisation des actions) doivent être enregistrées et communiquées au personnel (un plan type de revue de direction est détaillé dans la norme NF EN ISO 15189, décembre 2012, chapitre 4.15.2, « Éléments d'entrée de la revue »).

La revue de direction doit permettre de faire un point général sur le SMQ pour s'assurer qu'il demeure pertinent, efficient et qu'il permet de garantir la qualité des soins prodigués aux patients.

La direction analyse les données de l'année écoulée avec la cellule qualité et va définir, si besoin, de nouvelles orientations stratégiques (politique et objectifs qualité) pour améliorer les points sensibles identifiés, attribuer éventuellement de nouvelles ressources, définir une nouvelle feuille de route à la cellule qualité pour l'année à venir.

Il convient que l'intervalle entre les revues de direction ne dépasse pas 12 mois ; un intervalle plus court peut être utile lors de la mise en place ou de modifications importantes du SMQ.

Un compte-rendu doit être rédigé comportant les conclusions et plans d'actions. Il doit être diffusé à l'ensemble du personnel du LBM et à la direction de l'établissement en milieu hospitalier.

Chapitre 5 de la norme : exigences techniques

Ce chapitre sera abordé en insistant sur les particularités de la bactériologie.

Deux référentiels existent dans cette discipline : le REMIC, dont la dernière version date de 2015, et le CA-SFM/EUCAST révisé tous les ans, pour la réalisation des antibiogrammes.

Cas particulier de la microbiologie

La microbiologie médicale est fondamentalement différente des autres spécialités biologiques car elle s'intéresse au monde du vivant. Aussi, elle ne peut être appréhendée en matière d'accréditation de la même manière que les autres disciplines, telles que la biochimie, pour lesquelles les analyses visent à effectuer le dosage d'un substrat ou d'un constituant au sein d'un liquide biologique.

Pour la microbiologie, nous ne disposons majoritairement que de méthodes qualitatives car les notions de justesse, d'intervalle de mesure et d'incertitude sont difficiles, voire impossibles, à déterminer en fonction d'un facteur supplémentaire de variabilité qui n'existe pas dans les autres disciplines : un micro-organisme vivant.

L'analyse microbiologique ne peut pas être systématiquement encadrée par des CIQ fréquents et réguliers. La validation de ces méthodes en microbiologie est réalisée majoritairement sur un mode qualitatif. La maîtrise des risques repose essentiellement et avant tout sur l'habilitation et la maîtrise de la variabilité interopérateurs. La gestion du CIQ se fait de manière adaptée.

Mise en place des exigences techniques

Schématiquement, la qualité des résultats dépend de 5 paramètres (5M) :

- compétence du personnel (main-d'œuvre) ;
- maîtrise des conditions environnementales (milieu) ;
- conformité des échantillons, réactifs et consommables critiques (matières premières) ;
- maîtrise des automates, du matériel soumis à métrologie et des logiciels (matériel) ;
- qualité de la méthode sélectionnée par le responsable technique (méthode).

La maîtrise de ces 5 facteurs par le LBM est une des missions principales d'un évaluateur COFRAC.

Gestion des compétences – un point essentiel de l'accréditation

L'évaluation COFRAC a un double objectif étroitement lié aux deux chapitres de la norme : reconnaissance d'une organisation efficiente en amélioration continue permanente, et reconnaissance d'une compétence à réaliser les activités de la portée définie en conformité avec les recommandations de bonne pratique. Tout le personnel doit posséder les compétences requises pour les tâches à effectuer, particulièrement en bactériologie, spécialité encore manuelle.

Le développement professionnel continu (DPC) est obligatoire mais non suffisant.

Le LBM doit disposer d'une procédure pour la gestion du personnel. Les fiches de fonction, nominales, doivent décrire les responsabilités, les autorités et les tâches de l'ensemble du personnel.

Lors de l'accueil d'un nouvel arrivant, le LBM doit prévoir un programme de formation général et spécifique adapté au poste envisagé.

Le programme d'accueil d'un nouvel arrivant doit inclure les formations suivantes :

- SMQ (documents, non-conformités, actions correctives et préventives, politique qualité et objectifs, cartographie des processus, etc.) ;
- systèmes d'information du laboratoire (SIL, *middleware*, logiciel qualité, stock, CIQ, etc.) ;
- santé et sécurité ;
- éthique et confidentialité ;
- formations spécifiques au poste de travail prévu.

Le personnel en cours de formation doit être supervisé à tout moment.

Un programme de formation continue efficace doit être prévu afin d'assurer le maintien, l'amélioration ou l'acquisition de compétences par l'ensemble du personnel.

Suite à la formation initiale, le LBM doit évaluer les compétences de chaque personne à réaliser les tâches attribuées selon des critères objectifs prédéfinis (qualification).

Cette compétence peut être évaluée selon différentes modalités :

- observation directe d'activités (prélèvements, mise en culture ou réalisation d'un antibiogramme, maintenances, etc.) ;
- exploitation des enregistrements (passage de souches de CIQ/EEQ, temps de présence au poste, fiches de non-conformités, etc.) ;
- analyse d'échantillons (Lecture de Gram ou MGG, mélanges de bactéries, EEQ, etc.), sur la confrontation de l'examen direct rendu et des résultats de la culture, sur la comparaison des cytologies urinaires en manuel et automatisé, etc.

Les critères définis sont au choix du LBM. Ils doivent être objectifs et pertinents (points critiques des activités) ; les éléments de preuve ayant permis de valider les critères retenus doivent être prédéfinis et conservés (numéros de dossiers, dates d'observation, copies écran, données brutes automates, etc.).

La qualification associe des aptitudes de base et des compétences qui correspondent aux besoins spécifiques de l'activité. Les aptitudes peuvent être démontrées sur la base d'un diplôme, d'une expérience prouvée (par l'ancienneté dans la fonction), ou d'une formation.

La qualification ne peut donc pas être prononcée uniquement sur la base d'un diplôme.

Pour exercer seul en autonomie au poste de travail, le personnel doit être habilité, c'est-à-dire autorisé à réaliser les activités pour lesquelles il est qualifié. L'ensemble du personnel doit être habilité y compris les biologistes médicaux.

La réévaluation des compétences doit avoir lieu à intervalles réguliers. La fréquence est au choix du LBM ; elle doit être justifiée (analyse de risque par exemple) et peut être différente pour chaque qualification. Elle doit être systématique en cas d'arrêt prolongé de l'activité supérieure à 6 mois.

Les critères de maintien des compétences doivent être objectifs et prédéfinis ; ils peuvent être identiques aux critères de qualification initiale ou différents. La revue des performances du personnel est réalisée le plus souvent lors de l'entretien annuel individuel.

Pour les biologistes, peuvent être prises en compte la gestion des CIQ et des EEQ, la participation régulière à des staffs clinicobiologiques et des congrès, la veille bibliographique.

Le LBM doit tenir à jour un dossier pour chaque membre du personnel, biologistes compris. Le contenu doit être conforme aux exigences normatives (NF EN ISO ISO 15189, chapitre 5.1.9).

Il est important de bien conserver la traçabilité de toutes les formations réalisées (internes ou externes), des évaluations des compétences et des habilitations.

Locaux et maîtrise des conditions environnementales

Différents paramètres doivent être pris en compte parmi lesquels la température et la stérilité, la confidentialité des accès et des informations.

Le LBM doit organiser l'activité de telle façon à éviter toute contamination croisée lors des manipulations, en s'inspirant par exemple du principe de la marche en avant (démarche HACCP [*hazard analysis critical control point*]) et en organisant l'activité J_0 et J_n selon les règles applicables pour la gestion des flux. Les zones incompatibles doivent être clairement séparées (zones d'amplification moléculaire par exemple).

La bactériologie oblige à travailler sur des organismes vivants potentiellement infectieux, imposant des normes supplémentaires de sécurité comme la zone de sécurité

NSB 2, les hottes de type PSM II ou PSM III (arrêté du 16 juillet 2007, Conception des laboratoires d'analyses biologiques par l'Institut national de recherche et de sécurité [INRS]).

N.B. : Le respect de ces mesures de sécurité étant hors champ de la norme NF EN ISO 15189, aucun écart ne sera signifié par un auditeur COFRAC.

L'utilisation systématique de postes de sécurité microbiologique (PSM) est indispensable pour traiter certains échantillons précieux, normalement stériles, pour éviter leur contamination : prélèvements osseux, liquides de ponctions, etc.

Le LBM doit pouvoir apporter la preuve de la maîtrise de la contamination par l'environnement (NF EN ISO ISO 15189, chapitre 5.2.6). Il peut être utile de réaliser des contrôles réguliers de la biocontamination des surfaces critiques (tous les trimestres par exemple) à l'aide de géloses appropriées afin de vérifier l'efficacité des dispositions prévues pour la décontamination des surfaces. Il est indispensable de conserver les résultats des contrôles réalisés et des actions correctives éventuelles décidées.

La température des salles techniques et des zones de stockage doit être surveillée à l'aide de thermomètres raccordés au système international (SI). Les limites acceptables définies dans les différentes salles doivent prendre en compte les spécifications des fournisseurs pour les matériels, logiciels, réactifs et consommables présents.

Maîtrise du matériel

Les méthodes à privilégier sont celles des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (DMDIV) marqués CE ou celles publiées dans des livres faisant autorité, des journaux avec comité de lecture, des normes, des instructions de consensus international ou des réglementations. Elles sont dénommées « méthodes reconnues ». Avant leur utilisation en routine, elles devront être confirmées selon une démarche de vérification de méthode (portée A).

Lorsque les méthodes sont développées par le LBM, elles devront être confirmées selon une démarche de validation de méthode (portée B).

Le responsable technique définit un protocole de vérification/validation pour chaque méthode avec les critères de performances à évaluer et les limites acceptables préalablement déterminées (objectifs à atteindre). Une méthode d'analyse présente plusieurs caractéristiques essentielles (fidélité, justesse, variabilité interopérateurs, sensibilité et spécificité, etc.) que le LBM doit connaître. La connaissance de ces critères peut être acquise par les données fournisseur, la bibliographie et/ou par l'expérimentation sur site.

La description de la méthode, le tableau de maîtrise des risques, les résultats obtenus et leur interprétation, la déclaration d'aptitude de la méthode doivent être enregistrés dans un dossier de vérification/validation, dans un dossier type, le COFRAC SH FORM 43 (unique depuis le 15 avril 2015, que la méthode soit qualitative ou quantitative).

Le LBM qui s'inscrit dans une portée de type flexible est autorisé à réaliser des analyses selon un ensemble de techniques validées, à partir de méthodes définies, suivant le même principe en portée A ou à partir de méthodes définies qu'il pourra adapter, voire développer suivant le même principe en portée B.

Le LBM doit rédiger une procédure de gestion de portée flexible, qui liste l'ensemble des opérations à réaliser pour maîtriser le processus lors d'un changement, notamment la nouvelle vérification/validation de méthodes, la formation et l'habilitation du personnel, l'aménagement des locaux, la gestion des équipements, les contrôles de qualité. Cette procédure décrit l'ensemble des étapes du besoin initial du LBM jusqu'à la communication au COFRAC du changement (COFRAC SH GTA 04, chapitre 7.3).

Pour rappel, selon le QUAMIC, les techniques bactériologiques sont de type qualitatif, sauf la cytologie automatisée de l'ECBU, les amplifications géniques quantitatives, certaines sérologies ; contrairement à ce qui est affirmé dans le COFRAC SH GTA 04 : « les résultats de méthodes assimilées comme semi-quantitatives ou semi-qualitatives sont à considérer comme étant des méthodes quantitatives ».

Les maintenances préventives internes ou externes doivent être documentées, enregistrées (support papier ou logiciel), et validées par des contrôles qualité (CQ).

Toute anomalie doit être enregistrée (cahier ou fiche de vie). Une étude d'impact doit être systématiquement envisagée en cas de panne ou de CQ non conformes. Toute opération de maintenance importante nécessite la requalification de l'équipement, à l'aide par exemple des CIQ.

Lorsque le LBM possède plusieurs systèmes analytiques pour un même examen (automates en miroir, *back-up*, examens de biologie médicale délocalisés [EBMD], méthode manuelle/méthode automatique, sites différents, etc.), il doit prouver leur maîtrise à un niveau équivalent (CQ, comparaisons, etc.). Il est nécessaire de comparer lors de la vérification/validation initiale puis régulièrement les différentes méthodes et/ou équipements disponibles au LBM pour un même examen, afin d'assurer la cohérence biologique des dossiers patients.

Gestion du matériel critique soumis à métrologie

Une des exigences de la norme NF EN ISO 15189, décembre 2012, est l'obligation d'assurer la traçabilité des raccordements des grandeurs critiques affectant la qualité des résultats d'analyse de biologie médicale jusqu'aux étalons.

La métrologie est une discipline nouvelle dans le champ de compétences du biologiste. Les équipements critiques soumis à métrologie obéissent aux mêmes règles que pour tout matériel : identification univoque, traçabilité des maintenances et des anomalies, étalonnages réguliers, étude d'impact en cas de résultat non conforme, etc.

Dans le LBM, sont concernés les enceintes climatiques (étuves pour les grandeurs température et taux de CO_2, chambres froides positives et négatives), les pipettes de précision, les thermomètres, les centrifugeuses pour certaines utilisations, les balances utilisées pour préparer un réactif, etc.

Pour chaque équipement et chaque grandeur, les erreurs maximales tolérées (EMT) doivent être définies ; un programme d'étalonnage doit être documenté (type de raccordement, fréquence, etc.). Une procédure de gestion métrologique doit définir les responsabilités, le type de prestation, la conduite à tenir en cas de résultat non conforme.

Les prestations peuvent être internalisées (selon une démarche qualité NF EN ISO 17025), ou être externalisées,

via le département de biologie médicale ou via des prestataires externes à la structure (avec logo COFRAC ou équivalent sur le certificat d'étalonnage). Ces prestataires doivent être accrédités selon la norme ISO 17025.

Maîtrise des logiciels

Dans la version 2012 de la norme NF EN ISO 15189, le chapitre 5.10, gestion des informations au laboratoire, reprend ce qui n'était qu'une annexe dans la version 2007.

De nombreux logiciels sont utilisés pour la collecte, le traitement, le compte-rendu, le stockage ou la récupération des données : SIL, *middleware*, logiciel d'expertise identification et antibiogramme, logiciel d'étalonnage de matériel sous métrologie, tableurs utilisés pour les dossiers de vérification des performances, systèmes de validation automatique des résultats, etc.

Un dossier initial de vérification du bon fonctionnement doit être formalisé (vérification du paramétrage, jeux d'essai, vérification des transferts de données internes et externes vers les clients, intégrité des données dans les supports de sauvegarde, etc.). Avant chaque évolution de version, une étude d'impact doit être réalisée ; un protocole de vérification adapté doit être réalisé pour s'assurer que la nouvelle version est apte à l'utilisation en routine.

Le LBM doit conserver la trace de toutes les interventions et vérifications effectuées (cahier de vie à constituer pour chaque logiciel).

Ces logiciels doivent être vérifiés par le LBM en continu, a minima après chaque évolution de version, de même pour les automates. L'enregistrement des CIL comme un dossier patient peut participer de cette vérification.

Les saisies manuelles de données dans les systèmes d'informations (SI) sont fréquentes et doivent être systématiquement vérifiées :

- la vérification de la concordance des informations figurant sur la prescription, sur les échantillons biologiques et dans le dossier informatique du patient doit être systématique (COFRAC SH REF 02, chapitre 5.4.6) ;
- la vérification des autres saisies manuelles peut être réalisée systématiquement ou à fréquence définie, selon une analyse bénéfice/risque en fonction des types d'opération (COFRAC SH REF 02, chapitre 5.10.3).

Une cartographie décrivant les différentes interfaces, identifiant les serveurs critiques des non critiques, doit être envisagée.

Une procédure doit décrire les responsabilités et droits d'accès de l'ensemble du personnel.

Le LBM doit formaliser les procédures dégradées applicables en cas de panne (matériel ou logiciel) afin d'assurer la continuité des activités essentielles pendant les situations d'urgence. Il convient que les plans de fonctionnement dégradé soient périodiquement soumis à essai et que les tests réalisés soient conservés.

Le COFRAC SH GTA 02, guide technique d'accréditation pour l'évaluation des systèmes informatiques en biologie médicale, aborde différents chapitres : recensement et typologie des architectures de systèmes, préconisations pour le fonctionnement des systèmes informatiques en regard des exigences, validation et vérification des systèmes informatiques.

Maîtrise des réactifs et consommables

Les conditions d'entreposage des produits doivent être conformes aux spécifications fournisseur (température, lumière, etc.). Un système de gestion de stock (informatique ou autre) doit permettre de garantir la traçabilité des lots utilisés, l'absence de rupture de stock et d'utilisation de produits périmés.

Toute nouvelle formulation de trousse de réactifs, tout nouveau lot de fabrication ou toute nouvelle expédition doit être vérifiée en termes de performance avant utilisation. Il en est de même pour les consommables qui peuvent affecter la qualité des examens (milieux de culture, tubes de prélèvements, etc.).

La vérification des réactifs et des consommables peut être prouvée à l'aide du CIQ et des EEQ. Elle peut également être effectuée sur la base de la documentation des fournisseurs établissant clairement la conformité aux spécifications attendues par le LBM (certificats de conformité des milieux de culture par exemple, fiches de stress pour vérifier la conformité des transports, etc.). Le LBM doit conserver la trace des vérifications effectuées pour déclarer la conformité des produits en interne, avant utilisation pour les patients.

Gestion des événements indésirables

Dans le cadre de l'obligation réglementaire de déclaration (articles L.5222-3 et L.5222-4 du Code de la santé publique), les incidents pouvant être attribués à des réactifs ou consommables, des matériels ou des logiciels doivent être étudiés et signalés aux fabricants et aux autorités compétentes (Agence nationale de la sécurité du médicament et des produits de santé [ANSM]).

Le LBM doit consulter les alertes et mettre en œuvre les études d'impact et actions correctives/préventives nécessaires.

Processus métier

Processus préanalytique

C'est une étape critique en bactériologie. Deux difficultés majeures existent :

- *analyse d'organismes vivants :* les bactéries sont sujettes à leur environnement. Pendant le transport, si le délai d'acheminement est trop long, ou si le conditionnement n'est pas adapté, les résultats peuvent être faussés par excès (les résultats nécessitant une quantification comme les ECBU peuvent être surestimés suite à une multiplication bactérienne) ou peuvent être faussés par défaut (les bactéries ne sont plus viables, comme dans le cas des anaérobies par défaut d'atmosphère adéquate, ou des germes fragiles du type gonocoque) ;
- *variété du type d'échantillons* (sang, liquides de ponction, urines, abcès, pièces anatomiques, etc.) *et du site de prélèvement :* cette variabilité conduit à une certaine difficulté de la standardisation des méthodes de prélèvement.

Pour ce processus, une convention est établie entre la direction de l'établissement et le LBM.

Le LBM s'engage à diffuser les informations nécessaires aux prélèvements. Les dénominations « manuel de prélèvement » et « catalogue des examens » ont disparu de la norme NF EN ISO 15189 version 2012 : « le laboratoire doit mettre

des informations à la disposition des patients et des utilisateurs de ses prestations». Cela comprend les protocoles de prélèvement, la préparation des patients, l'identification des échantillons, les renseignements cliniques nécessaires, les conditions de stockage et d'acheminement (délai, température, agents stabilisants, sécurité, etc.).

Le LBM doit prévoir des supports pour le recueil des informations cliniques pertinentes pour les processus analytiques et postanalytiques, notamment l'interprétation des résultats (supports papier ou électronique dans un contexte de prescription connectée par exemple).

Quatre paramètres importants doivent être pris en compte pour le stockage et l'acheminement des échantillons : température, délai d'acheminement, sécurité, et absence de contamination croisée.

Le transport des prélèvements impose un conditionnement adapté : aussi souvent que possible, le LBM doit utiliser des milieux de conservation quand la mise en culture est différée (borate pour les urines, milieu type AMIES pour les écouvillons, milieu type Cary-Blair pour les selles, etc.).

La température d'acheminement doit être spécifiée (majoritairement à température ambiante; une métrologie des mallettes de transport peut être nécessaire).

Le délai d'acheminement idéalement décrit est moins de 2 heures en l'absence de conditionnement adapté.

Les règles de sécurité avec conditionnement hermétique, assurant l'intégrité de l'échantillon correspondent aux règles du transport des matières infectieuses (TMI) en cas de transport routier.

N.B. : Le respect de ces mesures de sécurité étant hors champ de la norme NF EN ISO 15189, aucun écart ne sera signifié par un auditeur COFRAC.

Un circuit de l'échantillon urgent doit être institué.

Des critères d'acceptation et de rejet des échantillons, conformes aux recommandations de bonnes pratiques et adaptés au contexte du LBM, doivent être définis et documentés.

Le LBM peut décider d'accepter des échantillons biologiques non conformes (échantillons précieux ou irremplaçables par exemple), s'il justifie cette dérogation et s'il mentionne dans le compte-rendu la nature de cette non-conformité majeure, susceptible d'avoir compromis le résultat. Le résultat analytique n'est pas rendu sous réserve, mais le client doit être clairement informé de cette non-conformité et de ses conséquences éventuelles.

Les renseignements cliniques sont essentiels en bactériologie : le type de site anatomique prélevé (notamment échantillons issus d'un milieu stérile ou d'un milieu contenant un microbiote), la méthode de prélèvement (écouvillon au lit du malade versus prélèvement au bloc opératoire, ou via un cathéter, etc.), l'histoire clinique du patient (antécédents d'antibiothérapie, d'immunodépression, etc.).

En fonction des renseignements cliniques, le biologiste pourra proposer des ajustements pour la phase analytique :

- ensemencer des milieux nutritifs supplémentaires ou particuliers en cas de faible volume d'échantillons, de suspicion d'infection liée à des germes fastidieux;
- recourir à des méthodes d'amplification moléculaire en cas de notion d'antibiothérapie récente, de suspicion d'infection liée à des germes fastidieux, de mise en place de sérologies, etc.

Le dialogue biologiste–clinicien est d'autant plus important que le biologiste est responsable de cette phase préanalytique même lorsque le prélèvement est réalisé en dehors du LBM. De plus, la norme oblige à une prestation de conseils à la phase préanalytique comme à la phase postanalytique : le biologiste peut modifier la prescription après accord du prescripteur, sauf urgence ou indisponibilité, pour l'adapter aux recommandations de bonnes pratiques (COFRAC SH REF 02). L'interprétation des résultats est une obligation légale (article L.6211-2 du Code de la santé publique).

La prescription connectée peut être une aide précieuse, car elle élimine certaines étapes intermédiaires de saisie et elle peut contraindre le clinicien à renseigner des champs obligatoires, à mentionner des renseignements cliniques.

Processus analytique

Les procédures analytiques doivent être documentées et conformes aux recommandations des sociétés savantes ou autres publications faisant autorité (REMIC, CA-SFM, etc.). Elles doivent être mises en œuvre dans les limites de l'utilisation prévue et vérifiées sur site pour s'assurer que les performances attendues sont atteintes dans les conditions de travail du laboratoire.

Les points essentiels suivants doivent être pris en compte :

- durée d'incubation et âge de la colonie : de nombreuses méthodes ne sont validées que pour des colonies de 16 à 24 heures (antibiogramme en milieu liquide ou gélosé par exemple);
- notion de milieu autorisé pour réaliser les identifications et antibiogrammes : certains milieux de culture ne sont pas validés (inhibiteurs ou substances chromogènes interférentes par exemple);
- standardisation et maîtrise de l'inoculum : un point critique à maîtriser impérativement (sensibilisation des opérateurs, étalonnage régulier des densitomètres, etc.).

Ces points doivent être évalués par le LBM mais ne modifient pas de principe le type de portée : portée A.

L'incertitude de mesure, dans les méthodes quantitatives, doit être évaluée quand cela est pertinent et possible : indicateur de performance de la méthode mais également donnée importante à diffuser aux biologistes signataires pour une prise en compte lors de la validation biologique (comparaison d'une valeur par rapport à un seuil décisionnel ou une antériorité par exemple).

Contrôles de qualité (CIQ, EEQ et autres comparaisons)

Le programme de contrôle de qualité doit être conçu pour assurer la maîtrise nécessaire et suffisante à un coût raisonnable. Il doit permettre une détection rapide et efficiente des anomalies, sans alertes inutiles.

Programme de contrôle interne de qualité (CIQ)

La gestion du contrôle de qualité est adaptée, en microbiologie, à la spécificité de l'activité (polyvalente, spécialisée) et à l'objectif clinique recherché.

Pour toutes les étapes techniques, aussi bien manuelles qu'automatisées (de la coloration de Gram à la réalisation de l'antibiogramme), des CIQ devraient être mis en place.

Ils constituent la validation continue du processus analytique et font suite à la vérification/validation initiale de la méthode. Ils permettent d'appréhender la fidélité intermédiaire (ou reproductibilité intralaboratoire) et la justesse (via l'externalisation des CIQ).

Mais les examens de bactériologie sont souvent des processus complexes avec plusieurs sous-processus étroitement liés les uns aux autres. L'identification d'une espèce bactérienne doit être en accord avec l'examen direct et l'antibiogramme avec l'identification ; le système est donc déjà en partie sous autocontrôle.

La fréquence de passage des CIQ est établie par le biologiste responsable technique qui doit réaliser une étude de criticité pour chaque réactif et chaque méthode pour définir un programme pertinent et adapté au contexte, explorant l'ensemble des méthodes (5M par exemple).

La fréquence (a priori au moins mensuelle) prend en compte différents facteurs tels que :

- la taille des séries ;
- la nécessité d'un CIQ en fin de série pour vérifier la maîtrise analytique de l'ensemble des échantillons analysés précédemment ;
- la validation de la régénération et/ou de la réception d'un réactif ;
- la validation d'une intervention sur un automate (maintenance, prise en charge d'une panne) ;
- le respect de la période probatoire à chaque changement de lot du CIQ.

Une procédure de gestion des CIQ doit être rédigée précisant entre autres la conduite à tenir en cas de CIQ non conforme.

Voici quelques exemples de CIQ en bactériologie (selon QUAMIC) :

- les contrôles des milieux de culture ne sont plus obligatoires ;
- pour les automates de cytologie urinaire, outre les CIQ fournisseurs, une comparaison des résultats de cytologie automatisée à une pratique manuelle permet un maintien des compétences des techniciens et une validation en continue de la méthode dégradée ;
- pour les colorations, un panel de souches tests permet de vérifier les performances des colorants et des méthodes utilisées. La démarche est complétée par la vérification quotidienne de la cohérence entre l'examen direct et les résultats des cultures ;
- pour les identifications et antibiogrammes, outre le panel de souches recommandées par le fournisseur, il est opportun d'inclure des espèces bactériennes représentatives de l'écologie bactérienne au sein du LBM, permettant notamment de valider les systèmes experts ;
- pour les hémocultures, il n'y a pas de CIQ particulier mais un suivi de la proportion des flacons positifs par compartiment, de la « diversité » des espèces bactériennes détectées, du volume de sang ensemencé par épisode infectieux, des faux positifs analytiques et/ou diagnostiques ;
- pour l'amplification moléculaire, il faut au moins un CIQ positif et un négatif.

Mais le passage d'un grand nombre de CIQ inadaptés au processus analytique (souches de référence par exemple) peut augmenter la charge de travail sans réelle valeur ajoutée pour la qualité des soins prodigués aux patients.

Il est préférable d'avoir moins de CIQ mais judicieusement choisis par rapport aux points critiques identifiés pour les différentes méthodes.

Évaluation de l'exactitude – EEQ et comparaisons interlaboratoires (CIL)

L'évaluation externe de la qualité (EEQ), sur des échantillons de résultats inconnus, est une obligation légale (article L.6221-9 du Code de la santé publique). Toutefois, tous les examens ne bénéficient pas d'un programme d'EEQ. Le LBM est dégagé de son obligation d'inscription quand il n'existe aucun organisme européen proposant un contrôle externe adapté pour cet examen.

Les LBM peuvent consulter le guide COFRAC SH INF 19 qui rassemble des informations sur les Organismes de comparaisons interlaboratoires (OCIL). Il est recommandé de privilégier les organismes accrédités (NF EN ISO 17043). Les OCIL sont considérés comme fournisseurs de services critiques et doivent être évalués (NF EN ISO 15189, chapitre 4.6).

Lorsqu'il n'existe aucun programme d'EEQ approprié pour un paramètre, le LBM doit élaborer un autre mécanisme d'évaluation des procédures analytiques (échanges d'échantillons entre laboratoires par exemple, analyse de matériaux de référence, repasse d'échantillons précédemment analysés, etc.).

La participation au Contrôle de qualité national (CQN), organisé par l'ANSM, est obligatoire mais non suffisante pour satisfaire aux exigences de la norme NF EN ISO 15189, décembre 2012.

Les offres commerciales de CIL sont encore insuffisantes en bactériologie car elles ne permettent pas de couvrir tous les points critiques d'une méthode bactériologique. Mais une approche transversale par famille de points critiques est conseillée ; une CIL pour la cytologie manuelle des ECBU pourra s'étendre à toute cytologie manuelle.

La fréquence de participation doit couvrir l'ensemble des examens de la portée d'accréditation au moins annuellement, et pour les examens les plus courants, chaque trimestre si possible.

Les CIL devraient suivre le même circuit qu'un échantillon patient, ce qui permet de valider les échanges d'information entre les différentes interfaces informatiques.

Une CIL doit être prise en charge sur tous les systèmes analytiques disponibles (automates en miroir, méthode *back-up*).

Les critères de performances attendus et spécifiques de chaque LBM doivent être documentés (note, Z-score, etc.).

L'OCIL doit mettre à disposition des comptes-rendus qui comportent une analyse statistique permettant au LBM de situer ses résultats par rapport à un groupe de comparaison (au moins 6 pairs).

La participation à des enquêtes épidémiologiques ou à des réseaux de type ONERBA (Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques) est un moyen supplémentaire de détecter des erreurs systématiques.

Une procédure de gestion des CIL doit être rédigée précisant entre autres la conduite à tenir en cas de CIL non conforme.

Gestion des résultats non conformes de CQ

En cas de résultat de CIQ ou d'EEQ non conforme, une non-conformité doit être enregistrée. Une analyse des causes doit être documentée (méthode 5M par exemple) ; une étude d'impact sur les prestations antérieures doit être réalisée. Une action corrective doit être mise en œuvre si besoin, notamment si les résultats d'analyses sont susceptibles de contenir des erreurs cliniques significatives (rappel patient, décongélation de la souche pour nouvelle analyse, courrier clinicien, etc.).

Processus postanalytique

Validation biologique et délai de rendu des résultats

Les résultats sont systématiquement validés par un biologiste, sauf cas particulier (a posteriori, après diffusion du résultat, en période de permanence des soins par exemple).

Le biologiste prend en compte les résultats de CIQ et les renseignements cliniques pour rendre des résultats interprétés. Les interprétations doivent être harmonisées au sein d'un même LBM (bibliothèque préétablie de commentaires validés par tous les biologistes signataires par exemple).

Les interprétations doivent reposer sur des données bibliographiques; celles-ci doivent être documentées dans le SMQ du laboratoire (NF EN ISO 15189, chapitre 5.8.3.k).

Les résultats d'examen doivent être communiqués dans un délai compatible avec l'état de l'art et les besoins cliniques, y compris dans les situations d'urgence. Tout résultat communiqué hors du LBM, au prescripteur et au patient, engage la responsabilité du biologiste médical, quelles que soient les modalités de communication, y compris la transmission sur un serveur de résultats.

La notion de « résultats provisoires » a été supprimée par la législation française (COFRAC SH REF 02).

Le compte-rendu d'examens, papier ou électronique, doit être conforme aux exigences normatives et réglementaires en vigueur (NF EN ISO 15189 et COFRAC SH REF 02, chapitre 5.8.3).

Le délai de rendu des résultats, notamment pour les demandes urgentes, doit être surveillé régulièrement (un des indicateurs qualité du laboratoire). Une procédure de gestion des échantillons urgents doit être établie.

Le LBM doit documenter la liste des résultats d'examens « alertes » ou « critiques » à communiquer sans délai au clinicien (risque vital pour le patient ou nécessité d'isolement pour éviter toute diffusion épidémique dans un établissement de soins par exemple). Le LBM doit assurer une confidentialité et une traçabilité rigoureuse de la communication de ces résultats (NF EN ISO 15189, chapitre 5.9.1).

Le LBM doit veiller à faire les déclarations obligatoires à l'Institut national de veille sanitaire (InVS). Les fiches de notification des 31 maladies à déclaration obligatoire sont disponibles sur le site internet de l'InVS (tuberculose, tularémie, brucellose, légionellose, etc., chapitre 40).

Toute souche utile doit être envoyée aux centres nationaux de référence (CNR) pour complément d'analyse éventuelle (typage salmonelle par exemple) et pour permettre une surveillance épidémiologique des infections.

La liste des CNR 2012–2016 est disponible au *Journal Officiel* (arrêté du 26 décembre 2011 modifié par l'arrêté du 24 juillet 2014, chapitre 41).

Conservation des échantillons et des souches isolées d'intérêt clinique

Le LBM doit documenter les règles de conservation des échantillons et des milieux de culture : durée, modalités, actions possibles (vérification d'identité et/ou analyse complémentaire).

Il est recommandé de conserver certaines souches bactériennes :

- souches isolées de prélèvements précieux (liquide céphalorachidien, hémocultures, prélèvements osseux, etc.) ;
- souches avec mécanismes de résistance particuliers.

Il peut être intéressant de conserver certaines souches (EEQ par exemple) pour réaliser des protocoles de vérification de méthode ou pour évaluer la compétence du personnel.

Prestations de conseil : préanalytique, analytique, postanalytique

Le LBM doit conseiller les clients sur les trois phases de l'examen de biologie médicale : conseil sur le choix des examens à prescrire en fonction du contexte clinique, modalités de prélèvement souvent essentielles en bactériologie, conditions de conservation et d'acheminement des spécimens, conseil sur la méthode la plus adaptée en fonction des signes cliniques (PCR ou sérologie par exemple), conseil en antibiothérapie, examens complémentaires éventuels, etc.

Le biologiste doit participer, aussi souvent que possible, aux différents comités de l'établissement : comité de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN), commission antibiotiques, réunions clinicobiologiques, etc.

Le LBM doit conserver les enregistrements des principales actions réalisées (compte-rendu de réunion, synthèse de la communication orale, lettres d'information, courriels, etc.). Des actions correctives doivent être entreprises si besoin (réunions d'information, amélioration des interprétations sur le compte-rendu, lettres d'information sur un sujet souvent demandé imparfaitement maîtrisé par les cliniciens, etc.).

En bactériologie, la prestation de conseils englobe aussi le conseil en antibiothérapie, qui demande une formation et une expérience certaines. Mais le champ d'action du microbiologiste doit être clairement défini, pour ne pas empiéter sur les prérogatives des infectiologues.

Exemple de COFRAC SH FORM 43 : vérification de méthode de l'antibiogramme en milieu solide

L'exemple est fourni à la figure 9.7.

Organisation de l'évaluation

La réalisation d'un audit technique en bactériologie nécessite une connaissance des référentiels utilisés, une bonne maîtrise des techniques et une pratique de l'audit.

Examen de biologie médicale		
Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) : étude qualitative de la sensibilité aux antibiotiques – antibiogramme en milieu solide		
Processus simple ☒ ; Processus complexe ☐ (nombre de sous-processus : …)		
Description du processus		
Sous-processus	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification/validation : ☒ 1. Répétabilité ☒ 2. Fidélité intermédiaire ☐ 3. Variabilité interopérateurs ☐ 4. Justesse ☒ 5. Exactitude ☐ 6. Sensibilité et spécificité analytique ☐ 7. Incertitudes ☐ 8. Étendue de mesure ☒ 9. Comparaison de méthodes ☐ 10. Interférences ☐ 11. Contamination ☐ 12. Robustesse et fiabilité des réactifs ☒ 13. Intervalle de référence
Sous-processus 1 : antibiogramme en milieu solide		
Portée A ☒ ; Portée B ☐ (à justifier)		

Description de la méthode	
Mesure de :	Croissance bactérienne en présence d'antibiotique en milieu solide
Principe de la méthode :	Qualitatif semi-automatisé (lecture par caméra) Mesure des diamètres et interprétation par comparaison aux normes du CA-SFM 20XX/rendu d'un résultat en catégories cliniques : sensible, intermédiaire ou résistant
Type d'échantillon primaire :	Tous les types de prélèvements à visée diagnostique et épidémiologique
Type de récipient, additifs :	Non applicable (souches bactériennes isolées des prélèvements cités ci-dessus)
Prétraitement de l'échantillon :	Colonies isolées de prélèvements
Unités :	Millimètre
Critères d'interprétation :	CA-SFM 20XX
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui
Codage CNQ (s'il existe) :	–
Équipement (instrument, analyseur, etc.) :	Densitomètre/étuve(s)/caméra
Référence du réactif :	Géloses Muller-Hinton (référence fournisseur) Solution NaCl (référence fournisseur) Écouvillon (fournisseur)
Matériau d'étalonnage (références) :	Souches ATCC
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Non applicable

Maîtrise des risques **(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)**				
5M	**Points critiques**	**Échelle de criticité**	**Éléments à maîtriser**	Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, etc.)/documents (procédure, instruction, enregistrement, etc.) avec les références du SMQ du laboratoire
Matière (échantillons)	Identité	15	Identification univoque de l'échantillon et des boîtes de Pétri sur lesquelles sont isolés les germes à analyser	Documents d'information pour les préleveurs/fiches techniques du LBM
	Identification des germes	10	Méthode d'identification	Procédure identification des germes
	Âge de la culture	2	Travail sur colonies ayant de 15 heures à plus de 72 heures de culture (variable selon les espèces bactériennes)	Fiches techniques définissant le temps de culture nécessaire avant la réalisation de l'antibiogramme avec précision des particularités

Fig. 9.7 **Exemple de COFRAC SH FORM 43 : vérification de méthode de l'antibiogramme en milieu solide.**

	Pureté de la souche	8	Vérification de la pureté de l'inoculum	
	Viabilité de la souche	10	Sélection du milieu antibiogramme adapté en fonction de l'espèce bactérienne	
	Prétraitement	2	Exception pour certains germes comme *Nocardia* spp. Maîtrise de l'inoculum (McFarland 0.5)	Fiches techniques propres aux genres listés Fiches techniques, utilisation des densimètres
	Interférences	5	Fragilité de certains germes anaérobie en atmosphère aérobie	Consignes rédigées par le LBM (temps à définir entre la réalisation de l'antibiogramme et la remise en atmosphère anaérobie)
Milieu	Conditions de conservation des échantillons (température, etc.)	2	Utilisation de sondes de température, de souches ATCC pour les contrôles d'atmosphère anaérobie ou micro-aérophile	Notices fournisseurs intégrées dans la documentation qualité Gestion métrologique des enceintes thermiques [ET] et des sondes
	Conditions de conservation et d'utilisation des réactifs (température, etc.)	3		
	Exigences environnementales pour le matériel ou l'opérateur	5	Utilisation de sondes pour la température ambiante Respect par le personnel des règles d'hygiène et de sécurité (classification des germes)	Notices fournisseurs intégrées dans la documentation qualité Gestion métrologique des ET et des sondes Fiche technique : élimination des déchets et hygiène et sécurité
Matériel (équipements)	Qualité des réactifs	5	Gestion des CIQ	Gestion des CIQ Notices fournisseurs intégrées dans la documentation qualité Définir les CIQ utiles en fonction de l'activité de ville ou hospitalière : exemples : • *Escherichia coli* ATCC 25922 • *Klebsielle pneumoniae* ATCC 700603 (BLSE) • *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 • *Staphylococcus aureus* ATCC 12493 (metiR) • *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 • *Enterococcus faecium* AUS0004 • *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 • *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 (sauvage) • *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 (β-lactamase négatif, ampi-R) • *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 • *Bacteroides fragilis* ATCC 23745 • *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 31486 • *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 • *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13636
	Surveillance des dérives	10	Suivi des CIQ et des EEQ	Gestion des CIQ et des EEQ Notices fournisseurs intégrées dans la documentation qualité
	Maintenance/utilisation et suivi des automates	10	Gestion documentaire	Documentation automates Suivi des maintenances Suivi des incidents automates
	Informatique embarquée	8	Gestion des systèmes « experts »	Suivi et qualification des logiciels embarqués Documents d'évaluation du système par des « jeux patients » ou « souches connues »
Matériel (réactifs)	Conservation et conditions d'utilisation	5	Conditions de conservation des réactifs	Notices fournisseurs intégrées dans la documentation qualité Gestion métrologique des EDT et des sondes
	Gestion des stocks	7	Gestion des stocks	Gestion des commandes et des stocks : documentation qualité
	Conservation des souches ATCC	2	Température de conservation afin de maintenir les plasmides	Fiche technique de conservation des souches ATCC à –70 °C
Méthode	Limites de la méthode (détection, quantification, linéarité, interférences, etc.)	10	Mise en place de tests complémentaires pour confirmer ou infirmer la présence d'un mécanisme de résistance (par exemple carbapénémase, BLSE, etc.)	Fiches techniques sur les examens complémentaires à réaliser en cas de phénotypes atypiques ou suspicion de mécanisme de résistance (carbapénémase, etc.) Fiche technique de transmission au CNR en cas de besoin d'expertise d'un mécanisme de résistance
	Causes d'incertitude de mesure		Non applicable	
Main-d'œuvre	Compétence et maintien de compétence du personnel	10	Suivi du maintien d'habilitation	Procédures et documentation qualité à citer

Fig. 9.7 **Vérification de méthode de l'antibiogramme en milieu solide.** *Suite.*

L'évaluation, qu'elle soit initiale, de surveillance ou d'extension, consiste en l'examen des dispositions organisationnelles et techniques, de l'application de ces dispositions, de la vie du système qualité au travers de l'examen des outils systémiques de progrès, de la compétence des personnes réalisant tout ou partie des prestations soumises à l'accréditation, de la réalisation de tout ou partie des prestations soumises à l'accréditation, des dispositions mises en œuvre pour assurer la qualité des résultats, et de la traçabilité enregistrée à partir de la revue de dossiers patients.

L'évaluation se fait par les moyens suivants :

- examen de la pertinence et de la conformité aux exigences d'accréditation des dispositions préétablies, d'ordre organisationnel et technique. Une analyse des principaux documents avant la confirmation de l'audit est réalisée par les auditeurs qualité et technique(s) (exemples de documents analysés : vérification/validation de méthodes de la portée demandée [SH FORM 43], procédure de gestion des portées d'accréditation, manuel de qualité, etc.) ;
- analyse de l'application de ces dispositions ;
- examen de l'adéquation des moyens du laboratoire pour réaliser les examens objet de sa demande d'extension d'accréditation ;
- analyse des documents et des enregistrements du système de management, à partir des documents demandés au laboratoire préalablement à la visite ou consultés sur place ;
- examen de la traçabilité documentaire des examens réalisés, notamment à partir des comptes-rendus de résultats ;
- examen des enregistrements liés entre autres à la réalisation et l'exploitation des audits internes et revues de direction et au traitement des outils de progrès ;
- entretiens avec le personnel, notamment nouveaux opérateurs et personnels d'encadrement ;
- évaluation de la maîtrise de la compétence du personnel du laboratoire pour les examens faisant l'objet de sa demande d'extension d'accréditation ;
- observation de la réalisation de tout ou partie des activités dans la portée d'accréditation revendiquée ;
- observation des actes techniques au regard des recommandations sélectionnés par le LBM ;
- examen de l'exploitation des résultats de comparaisons interlaboratoires, des contrôles qualité internes et des autres moyens d'assurance de la qualité des résultats d'analyse ;
- examen de l'usage prévu et effectif de la marque COFRAC (logotype ou référence textuelle) ;
- examen du traitement des écarts relevés lors des précédentes évaluations en vue de se prononcer sur leur solde en cas de surveillance ou d'extension ;
- vérification que les plans d'actions décidés à la suite des éventuels écarts relevés lors des précédentes évaluations ont effectivement été mis en œuvre, dans les délais définis par le laboratoire, et évaluation de l'efficacité.

En cas d'écart par rapport aux exigences d'accréditation et/ou aux dispositions du laboratoire, l'évaluateur établit une fiche d'écart critique ou non critique.

Conclusion

L'accréditation en bactériologie doit permettre au biologiste d'engager une réflexion globale sur chaque méthode, de mieux connaître et maîtriser les points critiques et donc d'améliorer la qualité des résultats et des prestations réalisés par le LBM. L'audit en bactériologie axé sur les points critiques et les interfaces des différents processus associés nécessite d'être mené sans excès de formalisme. Un audit en bactériologie permet d'analyser les points forts, les points faibles et les axes d'amélioration, ces deux derniers pouvant faire l'objet d'écarts. L'auditeur ne doit en aucun cas donner les solutions aux écarts. La rédaction de ces derniers dans la mesure du possible doit permettre à l'audité de percevoir les pistes d'amélioration à développer dans ses pratiques professionnelles.

En bactériologie, discipline encore globalement manuelle, travaillant sur des organismes vivants, la démarche d'accréditation demande un ajustement conséquent par rapport à des spécialités très automatisées comme la biochimie.

La phase préanalytique est plus difficile à standardiser. Les contrôles de qualité sont composés d'organismes vivants qui peuvent évoluer. La périodicité de ces contrôles et leur criticité doivent tenir compte de la population bactérienne rencontrée dans chaque LBM et de la lourdeur des techniques encore manuelles. L'éventail des CIL ne recouvre pas toutes les étapes des processus préanalytique, analytique et postanalytique. La phase postanalytique peut être difficile à harmoniser entre biologistes.

Le programme de CQ doit rester raisonnable, adapté aux points critiques identifiés ; il ne doit pas alourdir inutilement les postes de travail et mettre en jeu la pérennité des examens réalisés en interne par un coût démesuré.

Les contrôles de qualité sont nécessaires mais pas suffisants. La maîtrise des risques en amont est essentielle pour garantir la qualité des résultats : charge de l'inoculum, durée d'incubation, pureté de la souche, péremption des disques, etc.

Enfin, n'oublions jamais que notre finalité est de soigner des patients et pas des contrôles de qualité. Plus qu'ailleurs, les dispositions définies pour la gestion des contrôles de qualité doivent prendre en compte l'intérêt clinique.

Référence

[1] Ghnassia JC, Antoniotti G, Davin-Régli A. L'assurance qualité au laboratoire de bactériologie. In : Le diagnostic bactériologique. Paris : ESKA ; juin 2006. p. 1–16. Section I, chap. 12.

Références réglementaires

Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. (GBEA) JO n° 287 du 11 décembre 1999, p. 18441.

Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale. (GBEA) JO, no 104 du 4 mai 2002, p. 8375.

Ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale, parue dans le JO. du 15 janvier 2010, texte 43 sur 195.

Arrêté du 14 décembre 2010 publié dans le JO du 21 janvier 2011, définissant les conditions justificatives de l'entrée effective d'un laboratoire de biologie médicale dans une démarche d'accréditation.

Arrêté du 17 octobre 2012 définissant les conditions justificatives de l'entrée effective d'un laboratoire de biologie médicale dans une démarche d'accréditation. JO du 20 octobre 2012.

Loi n° 2013 13-442 du 30 mai 2013 portant réforme de la biologie médicale. JO du 31 mai 2013.

Décret n° 2015-205 du 23 février 2015 relatif aux modalités de dépôt des demandes d'accréditation des laboratoires de biologie médicale

prévues en application du I de l'article 7 de l'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.
Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment les mesures de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et de cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.
Arrêté du 24 juillet 2014 fixant la liste des centres nationaux de référence pour la lutte contre les maladies transmissibles et des laboratoires associés.

Références normatives générales

Laboratoires d'analyses de biologie médicale – Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. NF EN ISO 15189 : décembre 2012.
COFRAC SH REF 02 : Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012. Révision 04. Octobre 2013.
COFRAC SH REF 08 : Expression et évaluation des protées d'accréditation. Révision 01. Mars 2012.
COFRAC SH REF 04 : Recueil des critères complémentaires pour l'évaluation selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012. Révision 02. Décembre 2013.
Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale (GBEA). Arrêté du 2 novembre 1994 et arrêté du 26 novembre 1999.
Rémic. Référentiel en microbiologie médicale. In : Société française de microbiologie. 5e éd ; 2015.
Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM/EUCAST). Recommandations 2015, V. 2.0 juillet (www.sfm-microbiologie.org).

Documentations Cofrac

COFRAC SH INF 21 : résumé des principales différences entre les versions 2007 et 2012 de la norme NF EN ISO 15189. Révision 02. Janvier 2014.
COFRAC SH FORM 05, Demande d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 – Questionnaire de renseignements. Révision 07. Décembre 2014.
COFRAC SH FORM 03, Questionnaire d'auto-évaluation – Préparation de l'évaluation sur site selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012. Révision 02. Janvier 2014.
COFRAC SH FORM 43 : Fiche type de vérification (portée A)/validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale. Révision 01. 15 avril 2015.
COFRAC SH INF 50 : Portées types d'accréditation. Révision 01. Novembre 2013.
COFRAC SH GTA 02, Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des systèmes informatiques en biologie médicale. Révision 00. Juillet 2013.
COFRAC SH GTA 04, Guide technique d'accréditation de vérification (portée A)/validation (portée B) des méthodes en biologie médicale. Révision 04. Avril 2015.
COFRAC SH GTA 06, Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale. Révision 00. Juillet 2005.
COFRAC SH GTA 01, Guide technique d'accréditation en biologie médicale. Révision 01. Avril 2015.
SH INF 19 : Liste des organisateurs d'évaluation externe de la qualité. Révision 02. 15 septembre 2014.

Pour en savoir plus

Accréditation en bactériologie. RFL 2014 ; 461 : 3–102.
Conception des laboratoires d'analyses biologiques. INRS (Institut national de recherche et de sécurité) ; 2007. Disponible à l'adresse, www.inrs.fr.
Guide pratique sur l'application du règlement relatif au transport des matières infectieuses 2013–2014. WHO/HSE/GCR/2012.12.
Klein JP. L'accréditation : un panorama des raisons et des déraisons. RFL 2013 ; 457 : 25–8.
Klein JP. L'accréditation en bactériologie. RFL 2011 ; 436 : 39–50.
Klein JP. Le processus postanalytique en bactériologie clinique dans le cadre de l'accréditation. RFL 2013 ; 449 : 25–38.
Klein JP. Utilisation et exploitation des contrôles qualité en bactériologie. Spectra Biologie 2011 ; 190 : 54–64.
QUAMIC : Comité qualité de la société française de microbiologie. Recommandations, Disponible à l'adresse ; 2014, www.sfm-microbiologie.org.
Systèmes de management de la qualité – Principes essentiels et vocabulaires. NF EN ISO 9000 : décembre 2000 (AFNOR).

Chapitre 10

Microbiologie en post mortem

F. Denis, C. Piva, M. Mounier, V. Cattoir

PLAN DU CHAPITRE

La recherche microbienne post mortem peut être réalisée dans différents contextes :

- établissement d'un diagnostic lorsque le décès survient avant ou très rapidement après la prise en charge médicale lorsque l'on soupçonne une infection et que les recherches in vivo n'ont pu être pratiquées ou sont négatives (par exemple mort subite du nourrisson et de l'enfant) ;
- vérification de l'efficacité (ou de l'inefficacité) d'un traitement pour une infection avérée qui n'a pas permis la guérison ;
- évaluation d'un risque infectieux pour un pathologiste devant pratiquer une autopsie ;
- prise de décision d'autorisation ou non d'un embaumement et/ou de précautions particulières à prendre lors du dépôt en cercueil ;
- détermination du statut microbiologique des organes, tissus et cellules destinés à la greffe.

Nous nous limiterons au cas des bactéries, même si cette microbiologie post mortem concerne également virus, champignons et parasites.

Flore bactérienne ante mortem et post mortem

La flore bactérienne est de deux types, selon qu'elle :

- fait partie de la flore microbienne normale de tout individu, éventuellement modifiée quantitativement post mortem ;
- relève d'infections ou de portages d'agents pathogènes ne relevant pas de la flore normale.

Flore bactérienne « résidente » ou endogène

La flore de l'individu sain vivant est importante quantitativement et qualitativement (Tableau 10.1).

Tableau 10.1 **Flore commensale de l'homme [3].**

Flore	Densité	Principales espèces
Flore de la peau	10^2–10^5/cm^2	Staphylocoques, corynébactéries, etc.
Flore des voies digestives		
– Salive	10^5–10^6/ml	Streptocoques
– Plaque dentaire	10^9–10^{11}/ml	Streptocoques, *Actinomyces*
– Estomac	0	
– Duodéno-jéjunum	10^2–10^4/ml	Anaérobies (*Bacteroïdes, Clostridium*)
– Intestin grêle	10^7–10^8/ml	Entérobactéries, entérocoques
– Côlon	10^{11}/ml	
Flore des voies respiratoires		
– Nasopharynx – Trachée–bronches	Abondante 0	Streptocoques, staphylocoques
Flore des voies génitales		
– Urètre – Vagin	10^3/ml 10^9/ml	Staphylocoques, corynébactéries *Lactobacillus*, anaérobies

Les données « classiques » décrites ci-après sont à revoir à la lumière des connaissances nouvelles développées dans le chapitre 2 « Microbiotes humains ».

Flore intestinale

La flore intestinale est la plus importante sur le plan quantitatif. En effet, on estime que le tube digestif abrite près de 10^{14} micro-organismes, c'est-à-dire 10 fois plus que le nombre de cellules qui composent le corps humain.

La densité et la composition de la flore digestive varient tout au long du tube digestif. L'estomac, le duodénum et l'intestin grêle proximal contiennent peu de bactéries (10^3–10^4 micro-organismes/ml). La diversité et l'abondance de la flore s'accroissent dans l'iléon qui contient 10^8 micro-organismes/ml. Le côlon abrite la densité la plus forte avec 10^9 à 10^{11} germes par gramme de contenu. On retrouve entre 400 et 500 espèces différentes. Les bactéries anaérobies strictes dominent nettement, représentant 99,9 % de la flore colique. Le nombre de bactéries dans les fèces varie entre 10^{10} et 10^{11}/g. Les populations présentes à des taux supérieurs à 10^7 bactéries/g sont dites dominantes.

Parmi les anaérobies stricts, on retrouve des bactéries à Gram positif (*Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*) et à Gram négatif (*Bacteroides*, *Fusobacterium*) ; parmi les anaérobies facultatives, les *Escherichia coli*, les autres entérobactéries et les entérocoques sont à des concentrations 100 à 10 000 fois plus faibles que les anaérobies strictes.

Les germes, potentiellement les plus redoutables, trouvés dans le tube digestif sont les *Clostridium* et les entérobactéries qui auraient une densité respective de l'ordre de 10^9/g et de 10^7/g de selles. Rappelons que 95 % des cas de myonécrose sont dus à *Clostridium perfringens* ; sont plus rarement impliqués dans ce contexte de gangrène *C. novyi* et *C. septicum*.

Flore de la peau

Sur l'épiderme, les espèces les plus représentées sont d'une part les staphylocoques et apparentés (*Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, etc.) et d'autre part les corynébactéries, *Propionibacterium*, etc. Ces deux groupes représentent près de 90 % de la flore commensale.

L'humidité favorise la pullulation microbienne ; ainsi, le nombre de bactéries cutanées serait de l'ordre de 10^2/cm^2 en zone sèche et de 10^5/cm^2 en région humide (creux axillaire, aine, plis cutanés).

Flore des voies respiratoires

La flore du nasopharynx est dans l'ensemble celle de la salive, avec des streptocoques, des *Haemophilus*, des *Neisseria* et des anaérobies.

À noter que près de 50 % des sujets normaux sont porteurs de *Staphylococcus aureus*, notamment sur la peau elle-même, mais beaucoup plus souvent au niveau des orifices naturels (périnée, narines) ou sur le système pileux voire dans les selles.

La durée du portage de *S. aureus* peut aller de quelques jours à quelques années, même chez des sujets sains.

Il faut souligner le fait que l'individu sain n'est pas porteur de virus ou de parasites.

États septiques ante mortem

Sur une série de 150 malades décédés consécutivement dans un service de soins de longue durée, on a retrouvé un état septique ante mortem respectivement chez 40 et 63 % des patients selon que l'on examine le certificat de décès ou que l'on procède à une relecture du dossier.

Par ailleurs, la proportion d'hémocultures positives croît de 20 à 40 % dans un délai de 0 à 18 heures post mortem.

Modification de la flore « endogène » chez le cadavre

Au sein du tube digestif, premier site en densité microbienne de l'organisme, la flore se modifie en fonction du temps et des conditions (température notamment) de conservation du cadavre, avec destruction des microbes les plus fragiles.

Puis les germes diffusent à partir de ce site principal dans les autres compartiments et tissus de l'organisme du fait de la rupture de la barrière intestinale. Chez certains patients en phase préagonique, on peut à la faveur d'hémocultures révéler une bactériémie ante mortem avec notamment isolement de *Clostridium*.

Certains facteurs accélèrent la thanatomorphose et vont provoquer rapidement des écoulements. Parmi les facteurs cliniques ante mortem favorisant celle-ci, on note l'aérocolie (pouvant être liée à une neuropathie, à une occlusion mécanique ou métabolique, à un traitement atropinique), les chimiothérapies anticancéreuses, l'obésité, les œdèmes, l'encombrement des voies aériennes, les traumatismes térébrants. Les facteurs externes sont représentés par des conditions atmosphériques estivales et des équipements incorrects.

Bactéries « pathogènes » susceptibles de survivre dans les cadavres

De façon surprenante, la croissance des micro-organismes est plutôt inhibée que favorisée en post mortem précoce du fait du refroidissement du corps. Ainsi, un certain nombre de germes sont très fragiles et classiquement rapidement détruits. Il s'agit des *Neisseria* dont *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae, Branhamella, Haemophilus* et *Treponema*. D'autres sont plus résistants : *Staphylococcus aureus* est classiquement la plus résistante des bactéries non sporulées.

Les *Enterococcus* peuvent résister plusieurs jours alors que les *Streptococcus pyogenes* et *S. pneumoniae* sont détruits en quelques heures. Pour les bacilles à Gram négatif, si les *Salmonella* ou les *Vibrio cholerae* survivent dans le milieu extérieur plusieurs semaines et même peut-être des années pour *V. cholerae*, leur survie dans le tube digestif est moindre, mais dépasse plusieurs jours dans le cadavre. *Legionella pneumophila* a une température optimale de multiplication de 37 °C, mais survit bien à des températures plus basses ; elle est retrouvée viable plusieurs heures après le décès au niveau du tissu pulmonaire.

Yersinia pestis résiste plusieurs mois dans le milieu extérieur et plusieurs jours dans les cadavres au niveau des poumons ou dans les ganglions.

Mycobacterium tuberculosis résiste bien au froid et peut demeurer vivant plusieurs jours dans du matériel contaminé. *M. tuberculosis* reste au nombre des bactéries très contagieuses.

Les leptospires sont très résistantes dans le milieu extérieur et peuvent survivre également dans les cadavres qui peuvent être une source de contamination.

Enfin, les *Coxiella*, telle *C. burnetii*, peuvent résister au niveau du foie ou du sang. Elles résistent dans les sécrétions lysosomiales et un pH acide favorise leur métabolisme. Elles sont susceptibles d'être transmises par voie muqueuse. Leur résistance est comparable à celle des bactéries sporulées, rejoignant ainsi, voire dépassant *S. aureus*.

Mais les bactéries les plus résistantes restent indiscutablement les espèces sporulées qui peuvent survivre durant des mois, des années, voire des siècles.

Parmi les infections bactériennes faisant courir des risques aux médecins légistes et thanatopracteurs, on retrouve les *Clostridium* responsables de gangrènes et le charbon, dont l'agent *Bacillus anthracis* est un germe sporulé très contagieux et très résistant, ce qui vaut aux patients décédés de cette maladie de ne pas bénéficier de soins de conservation et d'avoir leur corps déposé en cercueil hermétique.

Diagnostic microbiologique sur cadavre

La recherche peut être effectuée sur sang obtenu par ponction cardiaque, liquide de séreuses, organes (foie, cerveau, lésions cutanées visibles, collections purulentes) (Tableau 10.2). Le délai optimal d'analyse de ces prélèvements est de 24 à 48 heures [6]. À noter que la translocation bactérienne en période post mortem est mineure dans les 24 premières heures ou si le corps a été conservé à + 4 °C [4, 6].

Des précautions « chirurgicales » doivent être prises pour réaliser des prélèvements aseptiquement comme pour les prélèvements ante mortem en vue de mise en culture ou de recherche génomique. En effet, la contamination externe doit être prise en considération et les prélèvements doivent être réalisés avant l'éviscération du corps [6]. Le transport doit être rapide, de même que la mise en culture ou le stockage en vue de la biologie moléculaire.

L'isolement de *Mycobacterium tuberculosis* ne pose pas de problème. En effet, les procédés de décontamination utilisés en routine, avant mise en culture, permettent de détruire la flore du cadavre et de préserver *M. tuberculosis*.

Pour les autres germes « pathogènes » ne faisant pas partie de la flore normale, *Listeria monocytogenes, Salmonella, Vibrio cholerae*, etc. l'isolement peut être obtenu avec ou sans enrichissement préalable en utilisant les milieux sélectifs tant que la flore cadavérique ou une antibiothérapie préalable n'ont pas détruit le germe.

Les recherches de *Bacillus anthracis, Yersinia pestis* doivent être réalisées dans des laboratoires de haute sécurité par du personnel entraîné.

L'identification de tous ces germes ne pose pas de problème technique.

L'interprétation des résultats peut être simple si les bactéries isolées ne peuvent pas être des contaminants ou si des bactéries endogènes du cadavre se sont multipliées dans les compartiments initialement stériles (*L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Vibrio*, *N. meningitidis*, *M. tuberculosis*, etc.). L'isolement en culture monomicrobienne d'un agent pathogène (par exemple *S. aureus*, *S. pneumoniae* ou *E. coli*) à partir du sang et/ou du liquide céphalorachidien (LCR) doit être considéré comme significatif [6]. L'interprétation est beaucoup plus délicate si on retrouve dans du sang du cœur ou des organes des espèces telles que *Staphylococcus* spp., des streptocoques non hémolytiques, des entérobactéries fréquemment retrouvées dans les cadavres (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, etc.) qui sont souvent retrouvées en culture polymicrobienne, mais absentes d'hémocultures réalisées en ante mortem. À noter qu'environ les deux tiers des hémocultures prélevées en post mortem restent stériles et que le taux de contamination doit être proche de celui de celles prélevées en ante mortem, soit environ 4 % [4, 6].

Mais l'intérêt de la culture ou de la PCR post mortem est indiscutable, notamment dans la mort subite du nourrisson [4], dans des méningites à *N. meningitidis*, *H. influenzae* sérotype b, *S. pneumoniae*, tout particulièrement dans un contexte de purpura fulminans.

Nous-même [5] avons montré que 10 heures après le décès, des espèces dites fragiles comme *N. meningitidis* sont encore cultivables (nez, surrénales, etc.). Par conséquent, la culture doit être tentée même après le décès.

Pour presque toutes les espèces, il existe des techniques d'amplification génique ou PCR permettant un diagnostic rétrospectif. Ces approches diagnostiques commencent à entrer dans la pratique courante pour les agents de méningites, pour *M. tuberculosis*, etc.

Dans ce contexte, la PCR permet de réaliser sur tous les prélèvements le diagnostic d'espèce. Dans notre étude, l'espèce, *N. meningitidis*, et le sérogroupe – groupe C en l'occurrence – ont pu être identifiés, rendant ainsi possible pour les sujets contacts de cas de méningites cérébrospinales la mise en œuvre d'une antibioprophylaxie et d'une vaccination spécifique.

Tableau 10.2 **Critères recommandés pour la réalisation d'une recherche bactérienne post mortem (adapté de [1]).**

Diagnostic suspecté	Prélèvements recommandés	Technique			
		Histopathologie	Examen direct	Culture	PCR
Septicémie	Sang du cœur, poumon, foie, rate	+	+	+	+
Méningite, encéphalite	LCR, tissu cérébral	+	+	+	+
Infection localisée (abcès, pneumonie, etc.)	Tissu ou organe cible	+	+	+	+
Légionellose	Poumon, sang du cœur, urines	+	–	+	+
Tuberculose	Poumon	+	+	+	
Infection disséminée à mycobactéries	Poumon, foie, rate, moelle osseuse	+	+	+	

LCR : liquide céphalorachidien ; PCR : *polymerase chain reaction*.

Cas particulier de la mort « subite » du nourrisson et de l'enfant

Les prélèvements doivent être effectués le plus tôt possible après la mort, si c'est possible. Les prélèvements sont assez semblables à ceux réalisés chez l'enfant vivant (hémocultures intracardiaques, stockage de sérum, ponction lombaire, prélèvements trachéopharyngés, bronchoalvéolaires, urines, etc.). Des prélèvements tissulaires sont réalisés lors de l'autopsie.

Mais d'autres prélèvements peuvent être réalisés à distance après analyse des circonstances de la mort et/ou sur la base de nouvelles données cliniques ou d'examens complémentaires. Parmi ces prélèvements additionnels, on distingue souvent les prélèvements de base (foie, poumon, cœur, rein, rate, méninges, plexus choroïdes, selles) et les prélèvements additionnels : épanchement de séreuses, prélèvements oto-rhino-laryngologiques ou de tout autre liquide, tissus ou organes en fonction des observations faites lors de l'autopsie.

En cas de mort subite du nourrisson, une recherche de toxine botulique doit être envisagée sur sérum.

Les aspects particuliers maternofœtaux sont développés dans le chapitre 24.

Précautions à respecter lors de la conservation des corps des autopsies et de la mise en bière

Dans la mesure où, bien souvent, on ne connaît pas les antécédents (médicaux, origine géographique, facteurs de risque, etc.) du patient à autopsier, il est logique de prendre des précautions optimales pour protéger le personnel lors des autopsies ou pour les personnes pratiquant des soins de conservation des corps.

Aussi, on doit respecter à la fois des précautions standard et des précautions complémentaires.

La tenue doit comporter : lunettes, masque, charlotte, casaque, bottes et gants, etc.

Comme pour des accidents d'exposition au sang (AES), même s'il y a blessure, les gants transpercés retiennent du matériel biologique et diminuent l'inoculum.

Il faut tenter de minimiser pendant l'autopsie les aérosols susceptibles de véhiculer les agents infectieux, notamment lors des opérations de sciage.

Après l'autopsie, table, instruments doivent être désinfectés suivant une procédure validée.

Les prélèvements de tissus doivent être fixés dans du Bouin et les autres spécimens à visée bactériologique doivent être ensemencés sur place, transportés rapidement, ou stockés au froid. Lors du transport, ils doivent être placés dans des containers étanches destinés à prévenir les risques biologiques.

La liste des germes et des maladies potentiellement transmissibles par les cadavres est longue. Les pathologies les plus redoutables sont celles qui font l'objet de textes interdisant les soins de conservation des corps (Tableau 10.3).

Tableau 10.3 **Interdiction des soins de conservation (cas où le corps doit être déposé en cercueil hermétique) et évolution de la législation.**

Arrêté du 17 novembre 1986	Arrêté du 20 juillet 1998
Cas où le corps doit être déposé en cercueil hermétique	
Variole et autres orthopoxviroses	Orthopoxviroses
Choléra	Choléra
Charbon	Charbon
Fièvres hémorragiques virales	Fièvres hémorragiques virales
	Peste
Autres cas *Mise en cercueil simple immédiate*	*Pas de précision sur le cercueil*
Peste	Hépatite virale
Hépatite virale sauf A confirmée	Rage
Rage	Infection à VIH
Sida	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
	Tout état septique grave (sur prescription du médecin traitant ou ayant établi le certificat de décès)

Conclusion

Le diagnostic d'une infection bactérienne post mortem peut être important pour identifier la cause d'un décès, dans une perspective scientifique et/ou médicolégale, mais aussi dans certains cas pour pouvoir prendre des mesures prophylactiques spécifiques pour l'entourage de la personne décédée (méningocoque, bacille tuberculeux, par exemple).

Les techniques de biologie moléculaire ouvrent des perspectives de diagnostic, même lorsque la bactérie n'est plus viable dans le cadavre.

On peut, avec Stratton et Decker [7], conclure que le risque d'exposition aux agents infectieux lors de prélèvements, de soins de corps et d'autopsies commence à être mieux connu et qu'il est souhaitable que soient réalisés des *Guidelines for performing autopsies* pour minimiser ce risque.

Cet aspect particulier de la bactériologie post mortem mérite l'attention car, dans certains cas, les prélèvements réalisés dans ce contexte permettent seuls de porter un diagnostic rétrospectif. Actuellement, il y a un manque de standardisation dans les procédures de prélèvements post mortem en Europe, mais une proposition récente vient d'être faite [2].

Il faut toutefois souligner la difficulté d'interprétation des résultats pour faire la part des bactéries authentiquement responsables d'une infection ante mortem, voire du décès, et celle des bactéries ayant diffusé soit ante mortem, soit post mortem à partir des compartiments riches en germes (essentiellement le tube digestif) dans le sang et dans différents organes.

Références

[1] Caplan MJ, Koontz FP. Post mortem microbiology. Cumitech 2001. n° 35. ASM Press Washington.

[2] Fernandez-Rodriguez A, Cohen MC, Lucena J, et al. How to optimize the yield of forensic and clinical post-mortem microbiology with an adequate sampling : a proposal for standardization. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015 ; 34 : 1045–57.

[3] Hygie V. Hygiène de la morgue. Hygiène hospitalière. Manuel de la lutte contre les infections nosocomiales C et R. In : La Madeleine ; 1988. p. 354–6.

[4] Morris JA, Harrison LM, Partridge SM. Post mortem bacteriology : a re-evaluation. J Clin Pathol 2006 ; 59 : 1–9.

[5] Ploy MC, Garnier F, Languepin J, et al. Interest of post mortem-collected specimens in the diagnostic of fulminant meningococcal sepsis. Diagn Microbiol Inf Dis 2005 ; 52 : 65–6.

[6] Riedel S. The value of postmortem microbiology cultures. J Clin Microbiol 2014 ; 52 : 1028–32.

[7] Stratton CW, Decker MD. Prevention of occupationally acquired infections in posthospital health care workers. In : Mayhall CG, editor. Hospital epidemiology and infection control. Baltimore : William & Wilkins ; 1996. p. 896–912.

Pour en savoir plus

Berche P. Les flores commensales de l'homme. In : Berche P, Gaillard JL, Simonet M, editors. Bactériologie. Paris : Médecine – Sciences Flammarion ; 1988. p. 1–8.

Burtonboye G, Delloye C. Polymerase reaction in cadaveric blood and tissues ? Transplant Proc 1996 ; 28 : 2927–8.

Denis F, Piva C, Mounier M. Risques infectieux en thanatologie. J Med Leg et Droit Med 2003 ; 46 : 41–7.

Orenstein JM. Guidelines for high risk or potentially high risk autopsy cases. Pathologist 1984 ; 38 : 33–4.

Rivollier E, Berthelot P. États septiques ante mortem et soins de conservation : quelles précautions pour quels risques ? Hygiene'S 2000 ; 8 : 264–74.

Roux AL, Rambaud C. Examen microbiologique des prélèvements post mortem. In : Société française de microbiologie. 5e éd REMIC ; 2015.

Chapitre 11

Incidents d'origine bactérienne liés aux greffes et transfusions

Rôle du laboratoire et contrôle microbiologique des tissus, cellules et matériel biologique à usage thérapeutique

F. Garnier, M. Drouet, F. Denis

PLAN DU CHAPITRE

Produits thérapeutiques d'origine humaine

Si l'utilisation de tissus et de cellules à usage thérapeutique est ancienne, l'organisation des structures de conservation de tissus et/ou cellules est récente et fait suite à l'application de décrets qui établissent les conditions d'autorisation d'ouverture des banques de tissus et des centres de thérapie cellulaire et d'arrêtés qui fixent les règles de bonnes pratiques relatives à l'utilisation thérapeutique des tissus ou des cellules humaines.

Les banques de tissus ont en charge les tissus ou leurs dérivés (cornée, peau, os, etc.), les centres de thérapies cellulaires prenant en charge les cellules (cellules souches hématopoïétiques (CSH), du sang périphérique ou du sang de cordon) et les cultures cellulaires effectuées à partir de prélèvements tissulaires ou cellulaires (culture de peau, clones antitumoraux). Ces deux activités sont très souvent prises en charge par la même structure (Tableau 11.1).

Les tissus et les cellules peuvent être prélevés sur des donneurs vivants ou décédés :

- **le don sur donneur décédé** peut s'effectuer sur un donneur en état de mort encéphalique lors du prélèvement des organes ou sur un donneur cadavérique dans les 6 heures après le décès ; ce délai peut être reporté à 24 heures si le corps a été conservé à +4 °C ;
- **le don du vivant** concerne surtout les résidus opératoires, les prélèvements de CSH et également les prélèvements autologues (tissus conservés pour être greffés chez le même malade).

Selon leur origine, ces éléments peuvent être stériles (résidu opératoire, CSH) ou potentiellement porteurs d'une flore bactérienne (cornée, peau).

En France, la qualification des donneurs d'organes, de tissus et de cellules nécessite des sérologies virales, hépatites B et C, VIH, etc.), parasitaire (toxoplasmose) mais aussi bactérienne (syphilis).

Tableau 11.1 **Tableau récapitulatif faisant la liste des principaux tissus utilisés actuellement, en précisant l'origine des donneurs, les conditions de stockage, les durées de conservation et les prélèvements effectués pour les contrôles microbiologiques.**

Produits humains	Conditions du prélèvement	Tissus stériles au moment du prélèvement	Conditions habituelles de conservation	Durée minimale des phases de quarantaine	Durée des phases de stockage	Échantillon pour le contrôle microbiologique
Cornées	Donneurs cadavériques ou en état de mort encéphalique	Non	31 °C ± 2 °C en milieu de culture (la conservation à 4 °C n'est pas autorisée en France)	10 jours	30–35 jours	5–10 ml de milieu de transport, de conservation et de déturgescence Collerette cornéenne postgreffe
Membranes amniotiques	Placenta prélevé lors d'une césarienne	Oui	–80 °C en RPMI –50 % glycérol	4 mois	2 ans	Milieu de lavages Biopsie d'amnios
Têtes fémorales	Résidus opératoires de donneur vivant	Oui	–80 °C, à sec dans un cryokit azote liquide	4 mois	5 ans	Prélèvement osseux sur la section au-delà 2 cm^3
Os massif ou segment	Donneurs en état de mort encéphalique (ou cadavériques)	Oui	–80 °C dans des poches de congélation azote liquide	4 mois	5 ans	Biopsie osseuse au cœur de l'os de 1–2 cm^3
Ligaments, tendons, cartilages, fascia lata	Donneurs en état de mort encéphalique	Oui	–80 °C, à sec dans un cryokit	4 mois	5 ans	Biopsie de 1 cm^3 sur la partie terminale du prélèvement
Volet crânien	Donneur autologue	Oui	–80 °C, à sec dans un cryokit	0 jour	5 ans	Biopsie de 1 cm^3 sur la partie terminale du prélèvement
Veines	Résidus opératoires de donneur vivant	Oui	–80 °C ou azote liquide, en présence d'un cryoconservateur	4 mois	5 ans	Biopsie de 1 cm de long sur une extrémité du prélèvement Liquides de prélèvement et de lavage
Artères	Donneurs en état de mort encéphalique	Oui	Azote liquide, en présence d'un cryoconservateur	4 mois	5 ans	Biopsie de 1 cm de long sur une extrémité du prélèvement Liquide de lavage
Valves cardiaques	Donneurs en état de mort encéphalique ou cœur d'un receveur de greffe de cœur	Oui	Azote liquide, en présence d'un cryoconservateur	4 mois	5 ans	Biopsie cardiaque adjacente au prélèvement Liquide de prélèvement et de lavage
Peau	Donneurs en état de mort encéphalique (ou cadavérique)	Non	Azote liquide, en présence d'un cryoconservateur	10 jours	5 ans	Biopsie de peau de 1–2 cm^2 Liquide de prélèvement et de lavage
Parathyroïdes	Donneur autologue	Oui	Azote liquide, en présence d'un cryoconservateur	0 jour	1 an	Liquide de prélèvement et de lavage
Cellules souches périphériques	Donneur autologue ou allogénique	Oui	Azote liquide, en présence d'un cryoconservateur	10 jours	10 ans	1–2 ml prélevé sur la poche Liquide de congélation et de lavage lors de la décongélation
Sang de cordon	Donneur allogénique	Oui	Azote liquide, en présence d'un cryoconservateur	10 jours	10 ans	1–2 ml prélevé sur la poche Liquide de congélation et de lavage lors de la décongélation

Étapes du procédé de production des produits humains à usage unique

Toutes les étapes allant du recueil à la distribution de ces dérivés du corps humains doivent être parfaitement décrites dans un manuel qualité, et être validées.

Les étapes comprennent : le prélèvement, la réception, la transformation, le stockage, la distribution, le transport.

Prélèvement

Le prélèvement est effectué par un médecin préleveur habilité qui doit s'assurer de l'absence de toute contre-indication médicale au prélèvement chez le donneur. Il effectue les prélèvements stérilement, éventuellement après avoir décontaminé les tissus. Ainsi, avant un prélèvement de cornée, le globe oculaire doit être décontaminé par application de Bétadine® aqueuse. Les prélèvements cellulaires ou tissulaires sont conditionnés pour le transport dans des emballages primaires (directement en contact avec les produits d'origine humaine) et secondaires. Les prélèvements de tissus sont systématiquement accompagnés de prélèvements sanguins qui permettront la réalisation de sérologies nécessaires à la qualification du donneur.

Réception

Lors de la réception à la banque, les tissus et les donneurs sont anonymisés. Les codes d'anonymat permettront la traçabilité des produits pendant tout le procédé sans que le nom du donneur et du receveur ne puissent figurer sur le même document.

Transformation

La transformation concerne toutes les étapes effectuées sur les produits cellulaires ou tissulaires pour assurer la validation du tissu. Si ces étapes nécessitent d'ouvrir l'emballage initial du tissu, elles doivent être effectuées dans une zone de classe D, les produits humains étant manipulés sous un poste de sécurité microbiologique (PSM), enceinte à flux laminaire (au minimum classe 100) avec du matériel à usage unique.

Différents contrôles sont effectués lors de cette étape afin de vérifier la stérilité et les qualités techniques du produit. Les contrôles de qualité diffèrent en fonction des produits. Ainsi, la validation d'une cornée impliquera la mesure de la densité des cellules endothéliales, alors que la validation d'un prélèvement de CSH impose la numération du nombre de cellules CD34 positives.

Stockage

Chaque produit est conservé dans des conditions de température qui lui sont propres (Tableau 11.1). Ce stockage peut être effectué en étuve à 31 °C, au congélateur à –80 °C ou en azote liquide. Le stockage doit être compartimenté en deux zones bien différenciées :

- la zone de quarantaine, qui permet la conservation des produits humains de la réception jusqu'à la validation de leur sécurité microbiologique et technique ;
- la zone de stockage de leur validation à la distribution.

Distribution

La distribution est effectuée sur présentation d'une ordonnance médicale. Dans tous les cas, après greffe du tissu, le greffeur devra remplir un certificat d'implantation et le retourner à l'unité de conservation de tissus ou cellules.

Transport

Concernant les produits humains à usage thérapeutique, les étapes de transport après prélèvement ou avant implantation doivent être sécurisées et répondre à des critères d'emballage et d'étiquetage très stricts. Ce transport est confié à des transporteurs agréés.

Incidents transfusionnels

Deux types de produits biologiques d'origine humaine peuvent être utilisés au cours des transfusions : les produits sanguins labiles (PSL) et les produits sanguins stables (médicaments dérivés du sang).

Les incidents avec PSL

Les incidents transfusionnels concernent principalement les PSL et relèvent de deux mécanismes :

- immunologiques :
  - réactions immuno-hématologiques ;
  - incompatibilité protéique ;
  - œdème pulmonaire lésionnel post-transfusionnel ;
  - allo-immunisation antileucoplaquettaire ;
  - réaction du greffon contre l'hôte post-transfusionnelle ;
  - immunisation de l'hémophilie A au facteur VIII ;
  - réactions allergiques.
- non immunologiques :
  - accidents infectieux ;
  - accident de surcharge.

Les signes traduisant une mauvaise tolérance d'une transfusion sont : hyperthermie avec ou sans frissons, agitation, sensation de chaleur, douleurs lombaires ou surtout thoraciques, hypotension voire collapsus ; plus rarement, hypertension, nausées ou vomissements, diarrhées, bouffées de chaleur, dyspnée, pâleur, sensation de prurit ou d'urticaire, saignements (en particulier aux points d'injection), tachycardie.

L'observation d'un ou de plusieurs de ces signes impose :

- l'arrêt immédiat de la transfusion, l'appel du médecin de proximité ;
- le maintien d'une voie d'abord pour la perfusion d'un soluté ;
- un examen clinique incluant la prise de la température, de la pression artérielle, de la mesure de la fréquence cardiaque, l'examen des urines ;
- la saisie de l'unité en cours de transfusion, des tubes de sang disponibles et des contrôles effectués ;
- la mise en place de mesures thérapeutiques immédiates (réanimation) ;
- la transmission des unités de sang au laboratoire de bactériologie en cas de suspicion d'accident par contamination bactérienne, au laboratoire d'immuno-hématologie en cas de suspicion d'accident immuno-hémolytique (accompagnées de prélèvements du malade), en informant les correspondants de l'établissement de soins et

de l'établissement de transfusion qui pourront coordonner ces actions et en diligenter d'autres en fonction des observations cliniques;
- l'ensemble des observations fera l'objet d'une déclaration dans les 48 heures au réseau d'hémovigilance (fiche d'incident transfusionnel).

Parmi les accidents infectieux, sont retrouvées les transmissions de maladies virales, de parasitoses et les infections bactériennes. L'infection microbienne par contamination bactérienne du produit sanguin transfusé est devenue aujourd'hui la principale contamination infectieuse transfusionnelle et la plus létale. Elle peut entraîner un choc septique ou endotoxinique immédiat et grave.

Espèces bactériennes incriminées

La répartition des espèces est très variable d'une enquête à l'autre, comme le montre le tableau 11.2. D'après l'étude Bacthem, les concentrés de globules rouges étaient en France majoritairement contaminés par bacilles à Gram négatif suivis des cocci à Gram positif (Tableau 11.2). Dans les concentrés plaquettaires, la part des cocci à Gram positif est sensiblement la même que celle des bacilles à Gram négatif ainsi que celle des bacilles à Gram positif.

Le risque de survenue et la gravité de l'incident transfusionnel par contamination bactérienne (ITCB) sont étroitement liés à la prolifération de la bactérie mais également à la production de molécules toxiques (toxines et/ou endotoxines). Bien qu'il ne soit pas possible de définir un seuil précis, une contamination supérieure $>10^5$ UFC/ml est considérée comme le seuil au-delà duquel l'ITCB sera grave. Dans certains cas particuliers, les conditions sont favorables à la prolifération des bactéries présentes (taille de l'inoculum, méthode de préparation, température de stockage, souche, PSL, etc.), alors le PSL devient un remarquable milieu de culture. Les concentrés de globules rouges (CRG) sont propices au développement des souches et espèces cryophiles (prolifération à +4 °C), du fait de leur température de stockage (+4 °C), telles que *Y. enterolitica*. Les concentrés plaquettaires (CP), conservés à une température de 22 °C, sont plus propices à la prolifération d'un grand nombre de bactéries. Ils constituent la catégorie de PSL la plus à risque. Le risque d'ITCB avec un CP est 5 fois supérieur à celui à la transfusion de CGR. Le risque est encore accru par l'emploi de mélanges de CP. Par ailleurs, le risque d'apparition d'ITCB s'accroît avec la durée de conservation des PSL (>8 jours pour les CGR et > 1 jour pour les CP, le risque est multiplié par deux).

Tableau 11.2 **Organismes isolés de concentrés de globules rouges et de concentrés plaquettaires lors d'incidents transfusionnels d'origine bactérienne lors des études Bacon, Shot et Bachtem (d'après Brecher et al.).**

Germes	États-Unis	Royaume-Uni	France
Concentrés de globules rouges			
Gram positif	40 %	50 %	44,8 %
Staphylococcus non *aureus*	40 %	50 %	10,3 %
Streptococcus sp.			13,8 %
Staphylococcus aureus			6,9 %
Enterococcus faecalis			3,45 %
Bacillus cereus			6,9 %
Propionibacterium acnes			3,45 %
Gram négatif	60 %	50 %	55,2 %
Serratia liquefaciens	40 %	25 %	6,9 %
Serratia marcescens	20 %		
Yersinia enterolitica		25 %	3,45 %
Enterobacter sp.			3,45 %
Acinetobacter sp.			17,25 %
Pseudomonas sp.			6,9 %
Escherichia coli			10,35 %
Klebsiella pneumoniae			3,45 %
Proteus mirabilis			3,45 %
Concentrés plaquettaires			
Gram positif	60,7 %	82,4 %	62,5 %
Bacillus cereus	3,6 %	23,5 %	12,5 %
Staphylococcus non *aureus*	32,1 %	35,3 %	31,25 %
Streptococcus sp.	10,7 %	11,8 %	
Staphylococcus aureus	14,3 %	11,8 %	
Propionibacterium acnes			18,75 %
Gram négatif	39,3 %	17,6 %	37,5 %
Klebsiella sp.			12,5 %
Serratia sp.	7,1 %		6,25 %
Escherichia coli	17,9 %	11,8 %	6,25 %
Acinetobacter sp.			6,25 %
Enterobacter sp.	7,1 %	5,8 %	6,25 %
Providentia rettgeri	3,6 %		
Yersinia enterolitica	3,6 %		

Contrôles microbiologiques

Prise en charge au laboratoire

Arrivé au laboratoire, le matériel doit être pris en charge par du personnel qui aura été formé et habilité par le responsable du laboratoire. Tout matériel à contrôler doit impérativement être manipulé sous un poste de sécurité microbiologique (PSM), enceinte à flux laminaire (au minimum classe 100) avec du matériel à usage unique. L'opérateur, après s'être lavé les mains de façon hygiénique à l'aide d'un savon doux ou d'une solution hydroalcoolique, met des gants.

Concernant les produits humains à usage thérapeutiques, ces contrôles s'imposent pour assurer la sécurité du receveur. Un contrôle microbiologique est effectué à chaque étape du procédé (Tableau 11.1).

Le premier contrôle est réalisé au moment de la réception dans la structure de conservation. Ce contrôle peut être réalisé sur une biopsie pratiquée au moment du prélèvement : biopsie osseuse de 1 à 2 cm^3, biopsie de peau, de vaisseau. Cette biopsie est recueillie à sec dans un flacon stérile et transportée à la banque dans les mêmes conditions que

le tissu. Ces biopsies ne peuvent être réalisées que si elles n'affectent pas l'intégrité et les propriétés thérapeutiques du tissu. Ce type de contrôle ne peut donc pas être pratiqué sur une cornée. Pour les tissus conditionnés en milieu liquide au moment du prélèvement, le contrôle microbiologique est réalisé par ensemencement du milieu de transport (par exemple cornée, membrane amniotique). Pour les prélèvements de CSH, le contrôle est effectué en prélevant 1 à 2 ml de la suspension cellulaire sur la poche de prélèvement.

Un deuxième contrôle devra être effectué à chaque manipulation du produit humain. Un contrôle est réalisé sur le liquide de lavage utilisé pour la décongélation du produit (par exemple décongélation des vaisseaux, des CSH). La conservation des cornées impose un changement de milieu de conservation dans les 24 à 72 heures après leur réception à la banque de tissus, puis 48 à 72 heures avant la greffe. À chaque changement, 5 à 10 ml du milieu de conservation sont prélevés pour la réalisation du contrôle microbiologique.

Un ultime contrôle peut être réalisé au moment de l'utilisation thérapeutique du produit, par ensemencement du milieu de transport (cornée) ou des résidus du tissu (collerette cornéenne; peau; amnios; os), ou sur la poche de CSH.

Pour les PSL, vu la circulaire n° DGS/SD3C/DHOS/AFFSAPS/2003/581 du 15 décembre 2003 relative aux recommandations concernant la conduite à tenir en cas de suspicion d'ITCB et les recommandations du groupe de travail « Validation des infections bactériennes transmises par transfusion » de l'AFFSAPS de janvier 2008, devant toute suspicion d'ITCB, la perfusion doit être arrêtée et la poche acheminée au laboratoire référent selon la procédure régionale définie entre le correspondant d'hémovigilance (CHV), le coordinateur régional d'hémovigilance (CRH) et la laboratoire référent. Le choix du laboratoire référent régional pour la prise en charge des examens bactériologiques dans le cadre des ITCB se fait conformément à la circulaire n° 03-851 du 15 décembre 2003. La poche devra être acheminée le plus rapidement possible au laboratoire, à température ambiante si le délai ne dépasse pas 2 heures, sinon à +4 °C, dans une caisse isotherme avec un dispositif de production de froid.

La poche doit parvenir au laboratoire dans son emballage protecteur d'origine avec une cheminée libre si possible (pour pouvoir effectuer les prélèvements) et la tubulure clampée sans aiguille (Fig. 11.1). Toute poche de sang non clampée ou percée doit être refusée. Le personnel doit vérifier que des hémocultures ont bien été réalisées; il est recommandé d'en pratiquer deux à une heure d'intervalle en précisant pour chaque flacon l'heure du prélèvement et si une antibiothérapie a été instaurée, ce à partir d'un abord veineux différent de celui sur lequel a eu lieu la perfusion. En fonction de la clinique, d'autres prélèvements à visée étiologique (culture du cathéter, recherche d'infection de site, examen cytobactériologique des urines, etc.) peuvent être nécessaires. Les surfaces à ponctionner doivent être désinfectées avec de l'alcool iodé à 1 % ou un désinfectant équivalent. Dégager la cheminée de connexion de la poche en écartant les languettes en plastique (Fig. 11.2A), la désinfecter et introduire le dispositif de prélèvement fourni par le centre de transfusion sanguine (Fig. 11.2B). Après désinfection de l'embout, prélever à l'aide d'une seringue de 10 ml le contenu de la poche pour l'examen microscopique et l'ensemencement des différents milieux (Fig. 11.2C). Si les poches sont vides, rincer la poche en injectant à l'aide d'une seringue au travers de l'embout 20 ml de soluté physiologique isotonique stérile puis les prélever comme précédemment.

Examen microscopique

Quel que soit le matériel contrôlé, une coloration de Gram et/ou, selon les cas, toute autre coloration que le biologiste juge nécessaire est réalisée. Si l'examen direct est positif, le service clinique concerné, l'établissement de transfusion sanguine et l'hémovigilance pour les PSL, le service clinique concerné, la biovigilance et l'Agence de la biomédecine pour les produits humains à usage thérapeutique seront prévenus le plus rapidement possible.

Mise en culture

Pour les produits humains à usage thérapeutique, la mise en culture pour les contrôles est réalisée soit directement au niveau des banques de tissus et des centres de thérapie cellulaire, soit au laboratoire de bactériologie qui prend en charge les différents contrôles. Quel que soit le matériel, des milieux solides et liquides sont ensemencés.

Milieux solides

À partir des biopsies, deux géloses au sang de cheval ou de mouton, une gélose CLED et une gélose « chocolat » Polyvitex® seront ensemencées, tandis que pour les milieux de transport, de conservation ou de lavage, ainsi que pour

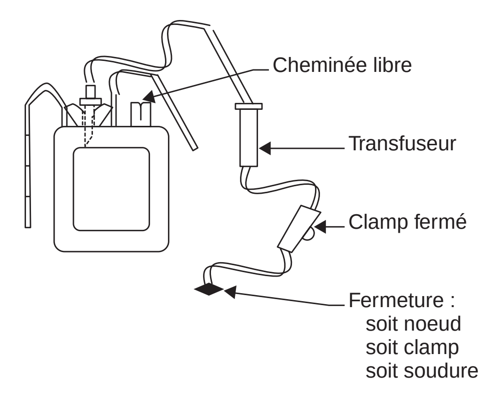


Fig. 11.1 Poche arrivant au laboratoire.

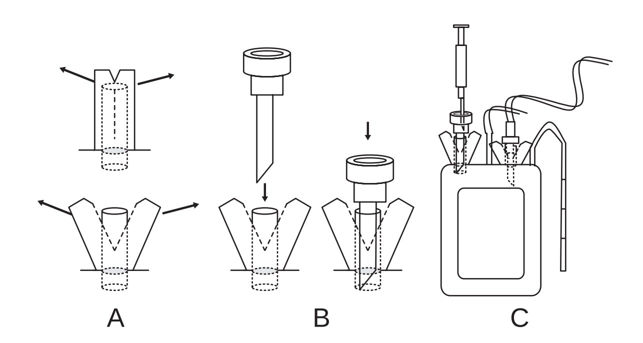


Fig. 11.2 Manœuvres à effectuer au laboratoire pour le prélèvement de la poche. **A.** Dégagement de la cheminée. **B.** Introduction du site de prélèvement. **C.** Prélèvement de la poche.

afssaps
Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

IBTT - FICHE DE LIAISON à renseigner
A joindre lors de la récupération des souches
à centraliser par le transporteur Afssaps

Unité Hémovigilance
Nom et adresse du laboratoire référent :
....
Nom prénom de la personne à contacter dans le laboratoire en cas de besoin : ....
....
Coordonnées téléphoniques :: Fax :
Email : ....
Date de l'envoi : ....
Fiche d'effet indésirable receveur numéro (FEIR) :
Nombre de souche(s) : ....

Origine du prélèvement de la (des) souche(s)			
PSL ☐	**Patient**☐	**Donneur** ☐	**Autres** ☐
Date de prélèvement : __/__/__	Date de prélèvement : __/__/__	Date de prélèvement : __/__/__	Date du prélèvement : __/__/__
Type de PSL : **CGR** ☐ **Plaquettes** ☐ **Plasma** ☐ **Autre PSL : préciser**	**Traitement antibiotique en cours :** **Oui** ☐ **Non** ☐ **Si oui, préciser :**	**Type de prélèvement effectué :** **Sang** ☐ **Cutané** ☐ **Orifices** ☐ **Autres :**..............	**Environnement** ☐ **Préciser :**.............. **Tube de qualification du don** ☐ **Cathéter** ☐ **Autres (préciser) :** ....
Examen enregistré : date :.................. numéro :...............	**Examen enregistré :** date :.................. numéro :...............	**Examen enregistré :** date :.................. numéro :...............	**Examen enregistré :** date :.................. numéro :...............
Résultats de l'identification :......	**Résultats de l'identification :**......	**Résultats de l'identification :**......	**Résultats de l'identification :**......... ....

* les tubes devront être identifiés avec le numéro d'examen

Commentaires éventuels :
....
....

Joindre les éléments de l'identification de la souche par le laboratoire : phénotypage, génotypage et autres éléments d'identification. Lorsque plusieurs souches sont concernées (patient, PSL…), joindre les antibiogrammes et les éléments de comparaison.

Cette fiche de renseignements devra être :
- faxée au : 01 55 87 41 12 (Afssaps) et fax du CRH concerné,
- envoyée conjointement au prélèvement(s) à centraliser à l'Afssaps.

25/27

Fig. 11.3 **Fiche de liaison devant accompagner la ou les souches incriminées dans une suspicion de contamination bactérienne de PSL et d'ITCB.**

les suspensions cellulaires, deux géloses au sang de cheval ou de mouton le seront. La première gélose au sang est incubée avec la gélose « chocolat » Polyvitex® à 37 °C sous CO_2 pendant 48 heures ; la gélose CLED est incubée à 37 °C en aérobiose pendant 48 heures, tandis que la deuxième gélose au sang est placée à 37 °C en anaérobiose pendant 5 jours.

Milieux liquides

Quel que soit le prélèvement, solide ou liquide, deux flacons pour hémoculture, référencés et enregistrés à l'Autorité nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), l'un pour l'aérobiose et l'autre pour l'anaérobiose, sont ensemencés. Ces milieux seront incubés à 37 °C pendant 10 jours, que la lecture soit faite à l'œil ou à l'aide d'un automate. En ce qui concerne les os, un repiquage systématique des flacons doit être réalisé quel que soit leur aspect en fin d'incubation.

Résultats

Lorsque les milieux solides sont positifs, une identification et un antibiogramme sont réalisés selon les procédures du laboratoire.

Lorsque les milieux liquides sont positifs, il convient de pratiquer :

- un examen microscopique ;
- un repiquage systématique des flacons sur :
  - une gélose au sang de cheval ou de mouton incubée à 37 °C en aérobiose pendant 48 heures pour le flacon aérobie ;
  - une gélose au sang de cheval ou de mouton incubée à 37 °C en aérobiose pendant 48 heures et une gélose au sang de cheval ou de mouton incubée à 37 °C en anaérobiose pendant 5 jours pour le flacon anaérobie.

En fonction de l'examen microscopique, le repiquage pourra être effectué sur tout autre milieu adapté.

Tout résultat positif est rapidement communiqué au service clinique concerné et à l'organisme chargé de la conservation. Lorsque la culture est positive sur un seul des milieux ou en cas de culture polymicrobienne, une discussion entre le bactériologiste et le clinicien est nécessaire afin de déterminer s'il peut s'agir ou non d'une contamination.

À partir des repiquages, une identification et un antibiogramme seront réalisés selon les procédures du laboratoire et la souche conservée à –80 °C. Pour les produits humains à usage thérapeutiques, il est recommandé de ne pas réaliser l'antibiogramme en première intention pour les souches de staphylocoques à coagulase négative, de *Propionibacterium acnes*, de *Bacillus* spp. et de corynébactéries.

Le biologiste devra aussi récupérer les données microbiologiques de tous les prélèvements pré- et post-intervention disponibles du receveur afin de recenser l'ensemble des éléments microbiologiques pour analyse et comparaison.

Si le même germe est retrouvé à la fois dans le matériel et dans un des prélèvements du receveur, le biologiste doit comparer phénotypiquement et génotypiquement les souches entre elles afin de déterminer si elles sont vraiment semblables. Si c'est le cas, pour les ICTB, les souches doivent alors être centralisées par l'ANSM et le biologiste sera alors le référent qui sera destinataire de la fiche de liaison (Fig. 11.3) à renseigner ; il devra coordonner l'enlèvement des souches par le transporteur jusqu'à leur réception à l'ANSM. Les souches accompagnées de la fiche de liaison sont récupérées par le transporteur et acheminées à l'unité de microbiologie de l'ANSM selon les « normes de conditionnement et d'expédition de matières infectieuses » en vigueur.

Quel que soit le résultat de la culture, négatif ou positif, un résultat définitif est transmis au service clinique concerné, au service de vigilance (hémo- ou bio-) et à l'organisme chargé de la conservation.

Pour en savoir plus

Agence de la biomédecine, Prévention de la transmission de bactéries et d'agents fongiques aux receveurs d'organes, recommandations professionnelles ; 2008.

Arrêté du 1er avril 1997 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement des tissus et au recueil des résidus opératoires issus du corps humain utilisés à des fins thérapeutiques. Journal Officiel du 6 avril 1997, p. 5275–80.

Arrêté du 16 décembre 1998 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement, au transport, à la transformation, y compris la conservation, des cellules souches hématopoïétiques issues du corps humain et des cellules mononucléées sanguines utilisées à des fins thérapeutiques. Journal Officiel du 30 décembre 1998, p. 19824–43.

Arrêté du 29 décembre 1998 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives à la conservation, à la transformation et au transport des tissus d'origine humaine utilisés à des fins thérapeutiques. Journal Officiel du 8 janvier 1999, p. 389–99.

Brecher ME, Hay SN. Bacterial contamination of blood components. Clin Microb Rev 2005 ; 18 : 195–204.

Cazenave JP. Les bactéries : je dépiste ou j'inactive ? Transfus Clin Biol 2007 ; 14 : 81–5.

Circulaire DBS (DH) AFS n° 85 du 10 octobre 1995.

Circulaire n° 03-851 du 15 décembre 2003.

De Micco P, Guilian C, Legrand D. Transfusion sanguine : une approche sécuritaire. In : Lefrère JJ, Rouger P, editors. Montrouge : John Libbey Eurotext ; 2000. p. 170–89.

Gain P, Thuret G, Chiquet C, et al. Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media. Br J Ophtalmol 2001 ; 85 : 1158–62.

Garnier F, Denis F. Rôle du laboratoire de bactériologie en cas de suspicion d'incidents transfusionnels bactériens. Spectra Biologie 2010 ; 180 : 34–9.

Larsen CP, Ezligni F, Hermansen NO, Kjeldsen J. Six year's experience of using the Bact/Alert system to screen all platelet concentrates to estimate the frequency of false-negative results. Vox Sang 2005 ; 88 : 93–7.

Morel P, Deschaseaux M, Bertrand X, et al. Transfusion et bactéries : risque résiduel et perspectives de prévention. Transfus Clin Biol 2003 ; 10 : 192–200.

Perez P, Salmi LR, Follea G, for the BACHTEM group, the French Haemovigilance Network, et al. Determinants of transfusion-associated bacterial contaminations : results of the French BACHTEM Case-Control Study. Transfus 2001 ; 41 : 862–72.

Recommandations du groupe de travail « Validation des infections bactériennes transmises par transfusion » de l'Affsaps de janvier 2008.

Sazama K. Bacteria in blood for transfusion. Arch Pathol Lab Med 1994 ; 118 : 350–65.

Wagner S. Transfusion-transmitted bacterial infection : risks, sources and interventions. Vox Sang 2004 ; 86 : 157–63.

Généralités

F. Denis

Le biologiste est responsable de l'analyse bactériologique des prélèvements provenant des patients (prélèvements qu'il a pratiqué lui-même ou qui lui ont été transmis) ; sa responsabilité va de la phase préanalytique jusqu'au résultat.

Afin de pouvoir optimiser la prise en charge des prélèvements, il doit disposer d'informations claires : données cliniques et biologiques concernant notamment la nature précise du prélèvement, le terrain (femme enceinte, diabétique, mucoviscidose, drépanocytaire, splénectomisé, greffé, transplanté, immunodéprimé), le traitement antibiotique préalable, ou les bactéries potentiellement causales. Certaines précisions sont également utiles telles que pays d'origine ou voyage à l'étranger (zone géographique, etc.). À titre d'exemple, l'étiologie des diarrhées varie beaucoup en fonction du pays de séjour (Tableau 12.1).

Certaines situations vont en effet requérir des recherches particulières.

Le biologiste procédera à un examen macroscopique de l'échantillon et réalisera sur celui-ci, souvent au préalable, une analyse qualitative voire quantitative de la cytologie avant de réaliser les examens relevant de la démarche bactériologique classique : diagnostic direct (avec examen direct et recherche qualitative ou quantitative des bactéries et/ou de leurs constituants, étude de la sensibilité aux antibiotiques) et diagnostic indirect ou sérodiagnostic.

Parallèlement à la démarche classique, les tests de diagnostic rapide (TDR), par exemple sur prélèvement de gorge à la recherche d'un streptocoque de groupe A, ou les recherches génomiques (méningites notamment) doivent trouver leur place sans se substituer au diagnostic traditionnel qui, à ce jour, est le seul à permettre la réalisation de l'antibiogramme. Rappelons que cet antibiogramme ne doit être réalisé que sur des souches potentiellement pathogènes afin de ne pas inciter les cliniciens à instaurer des antibiothérapies inutiles.

Le biologiste devra interpréter les résultats, même s'il ne maîtrise pas toutes les étapes préanalytiques ou tous les éléments cliniques. Le biologiste devra prendre en compte le diagnostic microbiologique dans sa globalité avec recherche d'agents pathogènes bactériens, viraux et parasitaires (Tableau 12.1).

Dans un certain nombre de situations, lorsqu'on examine des liquides normalement stériles, l'interprétation est simple (méningites purulentes avec examen direct évocateur et culture monomicrobienne ou plusieurs hémocultures positives avec le même germe, etc.). Dans d'autres cas, l'interprétation est plus délicate ; c'est le cas notamment si la flore est polymicrobienne et si la ou les bactéries potentiellement pathogènes doivent être isolées ou révélées sélectivement, voire quand le terrain fait que des espèces peu virulentes profitent d'un terrain favorable (patients fragilisés, immunodéprimés, patients poly-instrumentés) pouvant entraîner une infection. L'analyse critique des résultats doit se faire dans le cadre de confrontations clinicobiologiques. C'est également valable tant pour l'établissement du diagnostic que pour l'instauration du traitement, et fait partie de ce que

Tableau 12.1 **Importance estimée de chaque pathogène responsable de diarrhée du voyageur en fonction du pays de séjour.**

Étiologie	Amérique latine et Caraïbes (%)	Afrique (%)	Inde (%)	Asie du Sud-Est (%)
ETEC	12–34	16–35	24–31	7–13
EAEC	6–24	2–4	16	12
Shigella	0,3–7	9	8–10	2–4
Salmonella	3–8	2–6	7–10	9–11
Campylobacter	3–5	0,2–5	3–8	24–32
Aeromonas	0–1	2–3	3	3
Plesiomonas	0–1	2–3	5–7	5
Norovirus	9–17	13	Non connu	3–9
Protozoaires*	3	3	13	9
Pas de pathogène identifié	49	45	39	50

ETEC : *Escherichia coli* entérotoxinogène ; EAEC : *E. coli* entéro-adhérent.
* Protozoaires : *Giardia, Cryptosporidium, Cyclospora, Isospora, Entamoeba histolyca.*
D'après Laffont et al. [1].

l'on peut appeler un « code de bonne conduite entre biologiste et clinicien ».

La coordination entre biologistes et cliniciens doit être parfaite et le dialogue doit être permanent. Au quotidien, le biologiste doit souvent, devant une suspicion de méningite purulente, demander la réalisation d'hémocultures ou de prélèvements sériques pour recherche génomique, voire un prélèvement au niveau des lésions purpuriques ; ou devant un tableau de pneumopathie, il doit rappeler l'intérêt d'hémocultures, ou bien réclamer des urines pour pratiquer une recherche d'antigènes urinaires.

Afin de faciliter ces échanges clinicobiologiques, il est intéressant au niveau du laboratoire de sectoriser des paillasses consacrées à des services particuliers avec des techniciens et des biologistes dédiés. Il est souhaitable en termes d'efficacité de bien identifier les interlocuteurs privilégiés avec un numéro d'appel unique. Cela permet de faciliter les échanges et d'optimiser les pratiques.

Les principaux examens microbiologiques seront passés en revue, sous un angle pratique, en recourant à une démarche type, en analysant spécifiquement certains d'entre eux du fait de leur fréquence au sein du laboratoire (urines, hémocultures, coprocultures) ou de la gravité des infections diagnostiquées (méningites, septicémies, endocardites, etc.), mais aussi sous l'angle de tableaux particuliers (mère–enfant), voire dans un contexte plus spécifique tel que procréation médicalement assistée (PMA), contrôle de dons de sang ou tissus, etc.

Cette revue des principaux examens réalisés n'a pas pour ambition d'être exhaustive, mais d'examiner sous un angle pratique et critique la plupart des prélèvements que reçoivent les laboratoires de bactériologie, en excluant les prélèvements de l'environnement que le même laboratoire peut être amené à traiter, mais qui relèvent cette fois de l'hygiène. Des éléments complémentaires seront, bien sûr, trouvés pour certains prélèvements dans la partie consacrée à la systématique bactérienne. Nous sommes en accord avec Robert Vargues qui avait écrit dans la première édition de cet ouvrage : « Un des meilleurs contrôles de qualité du travail du bactériologiste, c'est de savoir que l'identification bactérienne qu'il a faite correspond au tableau clinique ; c'est aussi de savoir que l'antibiogramme qu'il a fourni a été utile ».

Sans disposer de boule de cristal, on peut affirmer que le futur microbiologique sera de plus en plus syndromique.

La technologie avance très rapidement. Si le diagnostic virologique progresse très vite avec les recherches génomiques donnant des diagnostics dans des délais d'une heure actuellement, du quart d'heure demain (sans que, en routine, la recherche de résistance aux antiviraux soit nécessaire), la bactériologie, même avec les perspectives enthousiasmantes offertes par la spectrométrie de masse et la détection génomique, rencontre plus de difficultés (du moins à ce jour) vu la diversité des germes et la nécessaire recherche de résistances aux antibiotiques qui, pour l'instant, échappe dans sa quasi-totalité aux nouveaux outils de diagnostic.

Dans un futur proche, les approches multiplexes coupleront la bactériologie, la virologie, voire la parasitologie dans un premier temps sur des prélèvements « nobles » (LCR, sang), voire les prélèvements génitaux, plus tardivement dans les syndromes respiratoires ou entériques notamment.

On doit s'attendre à de grands bouleversements dans la pratique en microbiologie, bouleversements auxquels nous devons nous préparer pour l'organisation des laboratoires, la formation des biologistes et des techniciens. Mais au sein de cette révolution annoncée, les microbiologistes ne doivent pas perdre leur âme ; ils doivent faire reconnaître leur rôle dans le diagnostic et l'interprétation des résultats (avec élaboration d'algorithmes) et ne pas devenir des presse-boutons sans compétence ni bon sens.

Référence

[1] Laffont MA, Martin-Blondel G, Marchou B. Conduite à tenir devant une diarrhée du voyageur. Rev Praticien 2015 ; 65 : 503–8.

Bactériémies et endocardites

F. Garnier, J.-L. Mainardi

PLAN DU CHAPITRE

13.1 Bactériémies

La bactériémie correspond à la présence de micro-organismes dans le sang circulant qui est normalement stérile. Actuellement, trois types de bactériémies peuvent être distingués :

- transitoires : qui correspondent à des décharges brèves de bactéries dans le sang, sans manifestations cliniques et spontanément résolutives ;
- continues : qui correspondent à des décharges continuelles qui se rencontrent notamment lors d'endocardites ou en cas de brucellose ou de fièvre typhoïde ;
- intermittentes : qui correspondent à des décharges bactériennes répétées à la suite d'infections diverses.

Qu'elles soient continues ou intermittentes, les bactériémies constituent toujours un état grave et redouté. Les bactériémies associées à de nombreux états infectieux résultent de décharges de bactéries à partir d'un foyer initial qui peut être d'accès difficile ou de localisation inconnue. Une fois entrée dans la circulation sanguine, la bactérie est susceptible de se propager et de s'installer dans d'autres sites.

Le diagnostic de la bactériémie se fait grâce à une hémoculture, prélèvement qui consiste à mettre en culture du sang circulant qui est normalement stérile, afin de pouvoir rapidement détecter et identifier l'agent infectieux responsable. Ainsi, des hémocultures sont systématiquement effectuées devant tout signe faisant supposer un syndrome infectieux (agression microbienne caractérisée par une réponse inflammatoire due à la présence de micro-organismes ou à leur passage à l'intérieur de tissus habituellement stériles) accompagné d'un état septicémique. La septicémie associe deux entités cliniques différentes, une bactériémie prolongée et un état infectieux qui peut aller du sepsis simple à l'état de choc septique. Un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) est la réponse à une agression grave (pas forcément infectieuse) de la part de l'organisme et est défini par la présence d'au moins deux des signes suivants :

- température > 38 °C ou < 36 °C ;
- fréquence cardiaque > 90/min ;
- fréquence respiratoire > 20/min ou $PaCO_2$ > 32 mmHg ;
- leucocytose > 12 000 ou < 4 000/mm^3 ou présence de plus de 10 % de polynucléaires immatures.

Le sepsis correspond à un SRIS dû à une infection. En revanche, le sepsis sévère est un sepsis associé à une/des hypoperfusion(s) d'organe(s) se traduisant par une acidose métabolique et/ou une hypoxémie (PaO_2 < 75 mmHg ou PaO_2 < 250 mmHg) et/ou une oligurie (< 0,5 ml/kg/h ou < 100 ml/3 h) et/ou une thrombopénie (< 100 000/mm^3 ou TP < 50 %) et/ou une encéphalopathie.

Enfin, le choc septique est un sepsis sévère associé à une hypotension artérielle malgré une expansion volémique adéquate et/ou la prise d'agents inotropes et/ou vasopresseurs.

Vitalité des corps bactériens dans les flacons d'hémoculture

Dans les flacons d'hémocultures, les bactéries peuvent se retrouver sous plusieurs formes :

- intactes : soit sous forme libre dans le plasma, en phase de multiplication active et les bactéries vont alors continuer à se multiplier ; soit sous forme libre mais en phase de repos. Elles ne commenceront alors à se développer qu'à la fin de cette phase de latence correspondant à leur adaptation au milieu nutritif du flacon ;
- lésées ou masquées : dans la circulation sanguine, divers systèmes permettent l'élimination des bactéries tels que le

système anticorps–complément ou les polynucléaires et les monocytes qui vont phagocyter les bactéries, ou la présence d'antibiotiques qui vont léser les bactéries. Dans ces deux dernières situations, la culture peut être obtenue après une lyse des cellules ou bien une neutralisation du ou des antibiotiques;
- cadavres : elles ne sont plus cultivables, mais certains de leurs constituants restent détectables (ADN, antigènes, toxines, etc.).

Milieux d'hémocultures

Que l'on ait recours à des hémocultures surveillées de manière manuelle ou automatisée, on ensemence généralement deux flacons pour chaque prélèvement, un flacon aérobie et un flacon anaérobie. Puisque l'isolement de bactéries anaérobies dans les hémocultures est en constante diminution, l'opportunité du flacon anaérobie pourrait être discutée, sauf lors de suspicion d'infections à point de départ gynécologique, oto-rhino-laryngologique ou colorectal. Cependant, certaines souches de streptocoques et d'entérocoques ont une croissance facilitée par une atmosphère anaérobie, et de nombreuses bactéries aéro-anaérobies, voire aérobies strictes (*Pseudomonas aeruginosa* en présence de nitrates) peuvent cultiver en anaérobiose. Enfin, le principal gain tient au fait que l'ensemencement du flacon anaérobie double le volume de sang mis en culture.

Nature du milieu

Actuellement, quatre milieux sont utilisés comme base :
- trypticase soja pour les flacons SA® (aérobies) et SN® (anaérobies) dépourvus de charbon de l'automate BacT/ALERT® (bioMérieux), les flacons BD Bactec® des automates Bactec® (Becton Dickinson) ainsi que pour les flacons manuels Signal® (Oxoid);
- trypticase soja + cœur-cervelle pour les flacons FA® (aérobies) et FN® (anaérobies) comportant du charbon de l'automate BacT/ALERT® (bioMérieux);
- trypticase soja enrichi en caséine-peptone suplémenté en acides aminés pour les flacons FA Plus® (aérobies), FN Plus® (anaérobies) et PF Plus® (pédiatriques) avec billes polymériques adsorbantes de l'automate BacT/ALERT® (bioMérieux);
- bouillon à base de peptones pour les flacons VersaTREK REDOX® de l'automate VersaTREK® (*Trek Diagnostic System*) commercialisé par la société i2A.

Tous ces milieux sont supplémentés avec des nutriments et des facteurs de croissance (vitamines, hémine, hydrates de carbone, cystéine, etc.) permettant la culture des micro-organismes retrouvés en pathologie humaine.

Conditions physicochimiques et additifs présents dans les milieux

Quels que soient les systèmes et les flacons utilisés, on joue sur plusieurs facteurs.

Pression

Les flacons utilisés pour les hémocultures sont fabriqués sous pression réduite (sous vide) permettant un ensemencement direct du flacon au travers d'un opercule.

Atmosphère

La plupart des flacons commercialisés comportent une atmosphère enrichie en CO_2 afin de favoriser la culture des germes exigeant une atmosphère enrichie en CO_2 tels que *Brucella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus* et *Campylobacter*, ce CO_2 constituant un facteur de croissance ou un facteur de départ pour de nombreuses espèces. En général, l'atmosphère des différents flacons est constituée de gaz tels que CO_2 et O_2 pour les flacons aérobies et CO_2 et H_2 ou N_2 pour les flacons anaérobies.

Anticoagulant

Le polyanéthol sulfonate de sodium (SPS) est l'anticoagulant le plus couramment utilisé dans les bouillons d'hémocultures. Selon les fabricants, sa concentration peut varier de 0,0125 % à 0,05 %. Le SPS possède des activités inhibitrices vis-à-vis de l'activité bactéricide du sérum, de la phagocytose cellulaire, du complément, du lysozyme, ainsi que sur certains antibiotiques tels que les aminosides. Toutefois, une concentration trop importante de SPS peut inhiber la culture de certaines souches de *Neisseria* spp., de *Peptostreptococcus anaerobius* ou de *Streptobacillus moniliformis*.

Neutralisation des antibiotiques

Pour certains flacons d'hémocultures, les fabricants ajoutent soit des résines adsorbantes de cations (Bactec®), soit du charbon activé (BacT/ALERT®), soit des billes polymériques adsorbantes échangeuses d'ions (BacT/ALERT®), substances qui auraient un effet neutralisant sur les antibiotiques. De toute manière, si le patient reçoit des antibiotiques, il est toujours conseillé de pratiquer le prélèvement à la « vallée », c'est-à-dire juste avant réadministration des antibiotiques, moment où leurs concentrations sanguines sont les plus faibles, ou après avoir pratiqué une « fenêtre thérapeutique ».

Les résines interviendraient aussi dans la lyse cellulaire, permettant la libération des bactéries intracellulaires. Il faut savoir que l'examen direct des flacons positifs comportant du charbon est rendu plus difficile que celui des flacons classiques ou même que celui des flacons à résine ou bille.

Systèmes

Systèmes manuels

Les systèmes manuels ne sont plus commercialisés actuellement que par deux laboratoires, Oxoid et son flacon Signal® ou son système Isolator®, et i2a qui commercialise les flacons VersaTREK REDOX® de l'automate VersaTREK® (*Trek Diagnostic System*). Ces différents flacons contiennent un milieu liquide nutritif et sont incubés à 35 à 37 °C à l'étuve pendant 7 jours en général.

Le système Signal® peut être équipé d'un indicateur permettant la mise en évidence d'une surpression due à la croissance bactérienne dans le flacon (Fig. 13.1D). Le désavantage de ce système tient à l'absence de flacon anaérobie.

Sur tous les flacons considérés comme négatifs, certains bactériologistes pratiquent des repiquages systématiques des flacons au 7e jour d'incubation; le gain n'est pas flagrant si ce n'est l'obtention de souillures ou de bactéries dont le pouvoir pathogène est discutable.



Fig. 13.1 Flacons d'hémocultures retrouvés sur le marché. **A.** Gamme de flacons pour les Bactec® (Becton Dickinson). **B.** Gamme de flacons pour le BacT/ALERT® (bioMérieux). **C.** Flacon manuel Signal® (Oxoid) équipé de son indicateur de croissance. **D.** Gamme de flacons pour le VersaTREK® (Trek Diagnostic System). **E.** Système Isolator® (Oxoid).

Pour les bactéries intracellulaires et les mycobactéries, un système particulier peut être utilisé, le système Isolator® (Oxoid). Le sang est directement prélevé dans le tube (Fig. 13.1E) sous vide contenant un anticoagulant et un agent lytique qui lyse rapidement les cellules. La phagocytose et l'activité bactéricide du sérum sont rapidement inactivées, permettant une concentration rapide des micro-organismes dans le lysat. Après centrifugation et élimination du surnageant, le lysat est mis en culture. Ce système très performant est néanmoins coûteux en réactif et en temps-technicien et possède un risque élevé de contamination au cours des différentes manipulations qu'il nécessite.

Systèmes automatisés

Actuellement, seulement trois systèmes automatisés sont disponibles sur le marché en France, le Bactec® (Becton-Dickinson), le BacT/ALERT® (bioMérieux) et le VersaTREK® (*Trek Diagnostic System*) (Fig. 13.2). Ces systèmes sont des appareils qui assurent en continu et simultanément la surveillance, l'agitation, excepté pour le flacon anaérobie du VersaTREK®, et l'incubation, de tous flacons d'hémocultures introduits. Les systèmes automatisés permettent de détecter plus facilement la croissance



Fig. 13.2 Appareils à hémocultures. **A, B.** Gamme Becton Dickinson. **C.** Gamme bioMérieux. **D.** Trek Diagnostic System®.

bactérienne tout en diminuant le temps d'incubation. Lors de sa croissance, la bactérie produit du CO_2, induisant soit une baisse du pH, qui sera détectée par l'automate à l'aide d'un sensor, par fluorescence (Bactec®), par réflectométrie (BacT/ALERT®), soit une modification de la pression à l'intérieur du flacon qui sera détectée par un capteur externe de pression (VersaTREK®). Pour chaque automate, les lectures s'effectuent toutes les 10 minutes, ce qui permet une détection précoce de la positivité d'un flacon. L'appareil avertit de tout résultat positif grâce à une alarme visuelle et/ou sonore.

Ainsi, une incubation de 5 jours est suffisante pour des flacons incubés à 35 °C sous agitation douce dans les automates.

Prélèvements

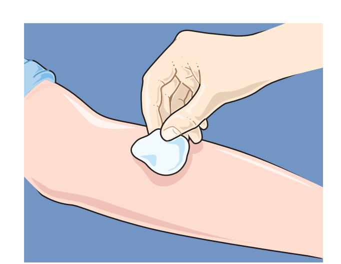
En milieu hospitalier, les hémocultures sont les prélèvements les plus fréquemment prescrits. Ainsi, à titre indicatif, au CHU de Limoges, le nombre annuel de paires de flacons d'hémoculture ensemencées est d'environ 30 000 pour 2100 lits. Toute fièvre inexpliquée, survenant particulièrement chez une femme enceinte ou chez un sujet immunodéprimé, accompagnée ou non de signes cliniques évocateurs d'infection, de SRIS ou de sepsis, donne lieu à la prescription d'hémocultures. Il est à noter que chaque patient peut développer un sepsis mais que les patients dont les défenses locales sont altérées (rupture de la barrière cutanée par exemple) deviennent à risque ; de même, ceux dont le système immunitaire est déficient sont à haut risque.

Mode de prélèvement (Fig. 13.3)

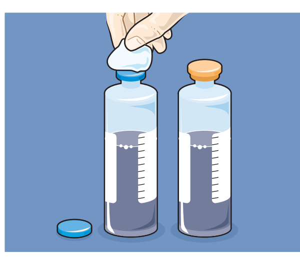
Le prélèvement doit être réalisé après une asepsie rigoureuse. Toute contamination par des germes cutanés ou ambiants peut compromettre la culture de la bactérie recherchée et/ou gêner l'interprétation du résultat. De plus, tout prélèvement sanguin est associé à un risque non négligeable d'accident d'exposition au sang (AES) pour le préleveur (au CHU de Limoges, 1,3 % des AES se sont produits lors de prélèvements pour hémocultures en 2004). De ce fait, pour tout établissement de santé, le protocole de prélèvement doit être strict et validé par le comité de lutte contre les infections nosocomiales (CLIN) local. Le port de gants est indispensable mais, au préalable, le préleveur doit impérativement se laver les mains avec une solution hydroalcoolique. L'asepsie de la peau du patient au point de ponction doit être une antisepsie cutanée en cinq temps :

- détersion avec le savon doux stérile ;
- rinçage à l'eau stérile ;
- séchage avec des compresses stériles ;
- application d'un antiseptique majeur alcoolique (PVPI ou chlorhexidine) ;
- séchage spontané.

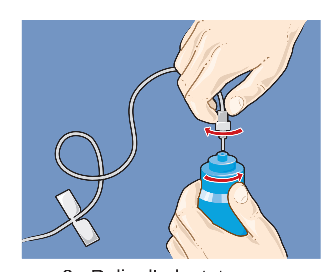
Le bouchon du flacon d'hémoculture est désinfecté soigneusement avec de la polyvidone iodée. Le système de prélèvement est généralement constitué d'une tubulure munie à chaque extrémité d'une aiguille, l'une servant à pratiquer la ponction veineuse et l'autre l'inoculation du flacon grâce à un adaptateur. Le matériel de ponction est de plus en plus sécurisé pour limiter le risque d'AES. Le flacon aérobie est préférentiellement ensemencé en premier, permettant ainsi d'évacuer l'air présent dans la tubulure avant d'inoculer le flacon anaérobie. La ponction veineuse constitue la méthode de prélèvement habituelle des hémocultures, les autres sites de ponction, cathéters veineux ou artériels par exemple, augmentant la fréquence des contaminants. Cependant, il faut bien garder à l'esprit que la peau possède une flore bactérienne où l'on retrouve principalement des staphylocoques et apparentés (*Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Micrococcus*, etc.) et des corynébactéries aérobies



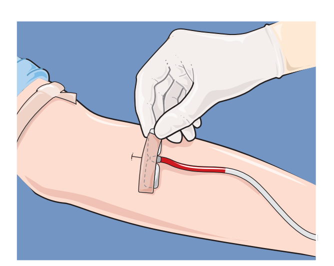
1 - Asepsie de la peau



2 - Désinfection des bouchons des flacons



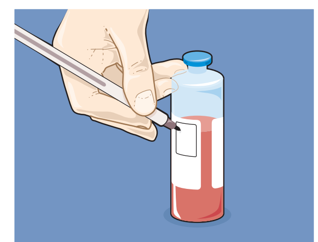
3 - Relier l'adaptateur au dispositif de prélèvement



4 - Pratiquer la ponction veineuse à l'aide de l'aiguille (type épicrânienne protégée)



5 - Placer l'adaptateur sur le flacon



6 - Étiqueter correctement le flacon

Fig. 13.3 Procédure de prélèvement direct des flacons d'hémocultures. *(D'après bioMérieux.)*

et anaérobies. Le nombre de bactéries cutanées est estimé entre 10^2 et 10^5 par cm^2, d'où l'importance d'une asepsie rigoureuse avant le prélèvement pour éviter tout risque de contamination des flacons par ces germes.

Afin de minimiser encore plus ce risque de contamination, certaines équipes préconisent maintenant d'éliminer le premier millilitre prélevé.

Quand prélever ?

Pour éviter tout faux négatif, il est impératif de pratiquer le prélèvement le plus tôt possible au cours de la maladie et surtout avant toute mise en route d'antibiothérapie. Dans le cas contraire, une fenêtre thérapeutique de 48 à 72 heures est recommandée. À l'exception des infections du système vasculaire où la bactériémie est continue, le moment du prélèvement est important car la bactériémie est discontinue, ce qui peut modifier la qualité du prélèvement. Les signes évocateurs sont très variés, notamment en fonction du foyer initial ; toutefois, on peut retrouver :

- des fièvres prolongées et inexpliquées ou évoluant par pics, signant la présence de bactéries dans le sang ;
- une hypotermie notamment pour des septicémies à cocci ou bacilles à Gram négatif témoignant d'un état infectieux sévère ;
- la survenue de frissons, de marbrures ou de sueurs ;
- une splénomégalie ;
- une suspicion d'endocardite ;
- tout signe traduisant un trouble de la coagulation sanguine, tel un purpura.

Il est à noter que, dans certaines circonstances (sujet âgé, immunodépression, traitement par des corticoïdes), nous pouvons être en présence d'une septicémie en l'absence de toute fièvre.

Nombre et volume

Plus que le nombre d'hémocultures, c'est le volume de sang prélevé qui est important. La densité bactérienne au cours des bactériémies est généralement faible chez l'adulte, de 1 à 10 UFC/ml. Le recueil d'un volume suffisant de sang est donc nécessaire pour augmenter les chances d'isolement, mais un ratio sang/bouillon doit être respecté car une dilution au 1/10e, voire au 1/5e, permet d'inactiver l'effet bactéricide du sérum et de diluer les antibiotiques éventuels. Chez l'adulte, un volume de 10 ml constitue donc un minimum et un doublement du volume (20 ml) augmente de 30 % la positivité des prélèvements. Deux à trois hémocultures par 24 heures sont généralement suffisantes pour isoler le germe responsable de la bactériémie. Un grand nombre de prélèvements exposant à une augmentation du risque de contamination, il est recommandé de ne pas dépasser 3 hémocultures par 24 heures, mais aussi maintenant de les réaliser en un seul et unique prélèvement, les trois à la suite.

Chez le nourrisson et l'enfant, la densité bactérienne étant plus élevée (souvent supérieure à 1000 UFC/ml), un volume de 1 à 2 ml est suffisant.

Acheminement

Les hémocultures doivent être acheminées le plus rapidement possible au laboratoire afin d'être introduites dans l'automate le plus tôt possible. Chaque hémoculture doit être étiquetée correctement et accompagnée d'une demande sur laquelle figureront : nom, prénom et date de naissance du patient ; le service d'origine ; la date, l'heure et le mode de prélèvement (veineux direct ou sur cathéter ou autre dispositif) ainsi que la température du patient au moment où il est effectué, sans oublier de mentionner une éventuelle antibiothérapie et la nature de celle-ci.

Incubation des flacons

Une incubation à 35 °C pendant 7 jours est recommandée pour les systèmes manuels. La lecture est visuelle et doit être réalisée deux fois par jour au cours des 48 premières heures, puis seulement une fois par jour pour les 5 jours suivants. L'observateur va rechercher la présence d'un trouble du milieu provoqué par la croissance bactérienne (bacilles à Gram négatif aérobies, *Staphylococcus* spp. et *Bacteroides* spp.), d'une hémolyse (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp. et *Bacillus* spp.), d'un coagulum (*Staphylococcus aureus*), de colonies au fond du flacon (*Streptococcus* spp. et *Nocardia* spp.), de production de gaz (bactéries aéro-anérobies facultatives et anaérobies strictes). Certains genres bactériens comme *Brucella*, *Haemophilus*, *Neisseria* et *Campylobacter* troublent peu ou pas le bouillon de culture, l'usage d'un flacon biphasique s'avérant alors utile.

En revanche, pour les systèmes automatisés, une incubation de 5 jours suffit. Au-delà de ce délai, les bactéries détectées sont généralement des contaminants qui étaient en très faible quantité.

La prolongation de l'incubation autrefois recommandée pour des micro-organismes particuliers comme les bactéries du groupe HACEK (*Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* et le genre *Kingella*) et *Brucella* spp. ou lorsqu'une endocardite est soupçonnée, n'est plus d'actualité du fait de la sensibilité actuelle des systèmes automatisés.

La lecture par réflectométrie, par fluorescence ou par détecteur de variation de pression toutes les 10 minutes à la recherche du CO_2 produit dans les flacons permet d'obtenir une représentation graphique au cours du temps. Un flacon sera alors détecté positif si sa production de CO_2 augmente au cours du temps de façon exponentielle.

En ce qui concerne les mycobactéries, leur recherche par hémocultures est traitée dans le chapitre particulier à ces germes (chapitre 34).

Traitement des flacons ensemencés

Devant toute suspicion de positivité (système manuel ou automatique), un examen microscopique et une mise en culture sont réalisés sur les flacons. Tout flacon considéré comme positif doit impérativement être manipulé sous un poste de

sécurité microbiologique (PSM), enceinte à flux laminaire (au minimum classe 100) avec du matériel à usage unique.

Examen microscopique

Sous un PSM, du bouillon est prélevé de façon aseptique après avoir désinfecté l'opercule du flacon à l'aide d'une seringue et du dispositif fourni par le fabricant. L'examen du bouillon est effectué en deux étapes :

- état frais afin d'observer la morphologie et la mobilité des bactéries ;
- coloration de Gram pour déterminer plus précisément la morphologie des bactéries, cocci ou bacille et leur affinité tinctoriale, caractère à Gram positif ou négatif. Pour certains germes, on peut avoir recours à d'autres colorations (bleu de méthylène, acridine orange, etc.). Tout résultat positif de l'examen direct doit être communiqué rapidement au clinicien, notamment si plusieurs flacons sont positifs, si l'examen direct est évocateur de *Clostridium* ou de *Neisseria*, ou si les patients sont à risque (immunodéprimés, aplasiques, tableaux de choc, etc.).

L'examen direct, morphologie et Gram, peut être trompeur et l'orientation initiale pourra être corrigée lors de l'examen direct des repiquages.

Ensemencement

Les repiquages des flacons suspects sont effectués en fonction de l'examen direct. Les cultures étant généralement monomicrobiennes, des milieux gélosés non sélectifs seront utilisés : géloses Columbia avec 5 % de sang incubées en aérobiose pendant 48 heures et en anaérobiose pendant 5 jours, géloses au sang cuit enrichies (Polyvitex®) placés sous CO_2 pendant 48 heures lorsqu'un *Haemophilus* spp. ou une *Neisseria* spp. sont évoqués.

Si à l'examen direct un mélange de bactéries est suspecté, des milieux sélectifs pourront alors être utilisés : la gélose ANC (acide nalidixique-colistine) ou la gélose CAP (colistine-aztréonam) pour isoler sélectivement les bactéries à Gram positif et la gélose CLED pour les bacilles à Gram négatif. Le choix de l'atmosphère (aérobiose, CO_2 ou anaérobiose) pour l'incubation de ces milieux à 37 °C dépend du diagnostic présomptif.

Les flacons sont conservés à température ambiante pour un éventuel nouveau repiquage ultérieur si les cultures sont restées négatives.

De plus, sur des hémocultures monomicrobiennes, il est possible, à partir d'un culot lavé, de réaliser directement un antibiogramme, soit manuellement, soit à l'aide d'une galerie ou d'un automate en fonction de l'équipement du laboratoire. Suivant le type bactérien observé à la coloration de Gram, une identification sera parallèlement lancée. Les résultats n'auront alors de valeur que si l'isolement observé le lendemain est bien monomicrobien. Dans le cas contraire, à partir des colonies des repiquages, seront pratiquées une identification et une étude la sensibilité aux antibiotiques de la ou des souche(s) isolée(s).

Afin de gagner du temps lorsque l'on suspecte *S. pneumoniae*, une recherche d'antigène soluble peut être réalisée directement sur le surnageant du flacon d'hémoculture à l'aide du kit Now® *Streptococcus pneumoniae* de chez Binax.

Dernièrement, l'identification par la technique de spectrométrie de masse a connu un essor et plusieurs études montrent de bonnes sensibilité et spécificité de cette technique pour l'identification du germe soit directement à partir d'un flacon positif, soit après 2 à 6 heures de culture selon les études.

Enfin, certains fabricants proposent différentes solutions de biologie moléculaire pour l'identification directement à partir d'un flacon positif :

- extraction et identification de *S. aureus* avec recherche en parallèle de la méticillino-résistance à l'aide du kit Xpert® MRSA/SA BC (Cepheid) utilisé sur l'appareil GeneXpert® (Cepheid) lorsqu'à la coloration de Gram on retrouve des cocci à Gram positif en amas ;
- extraction suivie d'une PCR et d'une hybridation sur bande de nitrocellulose avec les kits Genotype BC® Gram négatif ou Gram positif suivant l'examen direct du flacon positif, ces kits permettant ainsi l'identification de différents germes ainsi que la recherche de gènes de résistance, *mecA* et *van* ;
- extraction et identification de 27 cibles (24 pathogènes et 3 gènes de résistance) à l'aide de FilmArray® Blood Culture Identification Panel (bioMérieux).

Hémocultures positives

Alors que, dans les années 1990, le rapport bactéries à Gram négatif/bactéries à Gram positif isolées des hémocultures tendait à s'équilibrer, nous avons assisté à une modification de ce rapport ces 15 dernières années en Europe (Tableau 13.1), voyant les bactéries à Gram positif revenir en tête. Ce changement est dû à une augmentation d'hémocultures positives à staphylocoques à coagulase négative du fait du nombre important de patients porteurs de cathéters intravasculaires. Parmi les agents retrouvés dans les hémocultures positives, les espèces les plus fréquemment isolées actuellement sont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négative (Tableau 13.1). Parmi les germes à Gram négatif, on retrouve d'autres espèces de la famille des entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* et *Proteus mirabilis*), *Pseudomonas aeruginosa* et, parmi les Gram positif, streptocoques et entérocoques sont retrouvés dans des proportions variables selon les établissements et les services. En revanche, la fréquence d'isolement des bactéries anaérobies reste faible, en général inférieure à 3 % depuis 15 ans (Tableau 13.1).

L'interprétation des hémocultures positives est simple si le même germe est retrouvé à partir de plusieurs prélèvements et si la clinique est évocatrice. De plus, lorsqu'un pathogène spécifique (*Brucella* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, Groupe HACEK, *Pasteurella* spp., *Campylobacter* spp., *Bacteroides* spp. et éléments fongiques) est retrouvé, même à partir d'une seule hémoculture positive, l'étiologie de l'infection ne fait aucun doute. En revanche, lorsqu'un germe commensal est isolé sur les deux flacons d'une seule hémoculture ou à partir d'un seul flacon, le bactériologiste doit tenter de faire une distinction entre souillure et véritable infection. Cette interprétation est impossible sans une étroite collaboration avec

Tableau 13.1 **Répartition des principales espèces bactériennes isolées d'hémocultures d'après diverses études.**

Micro-organisme	1990[1] (%)	1997[2] (%)	1997–1998[3] (%)	2002[4] (%)	2005[5] (%)	2010[6] (%)
Gram positif	**44,8**	**40,4**	**52,9**	**54,3**	**61**	**67**
SCN	9,2	5,1	17,8		16,2	42
Staphylococcus aureus	18,9	14,7	15,1		8,6	9,7
Streptococcus pneumoniae	3,6	5,1	5,9		2,3	2,2
Enterococcus sp.	6,9	7,7	4,6		4,8	4,1
Autres Gram positifs	6,2	7,7	9,5		29	9
Gram négatif	**42,5**	**43,5**	**41,2**	**38,8**	**32,1**	**26,6**
Escherichia coli	15	23,1	14,5		13,5	13,4
Klebsiella pneumoniae	6,9	4,5	5,3		2,2	2,4
Autres entérobactéries	11	3,2	3,9		6,3	6,6
Pseudomonas aeruginosa	5,6	5,1	5,3		3,9	2,9
Autres Gram négatifs	4	7,6	12,2		6,2	1,3
Anaérobies	**3,9**	**1,3**	**1,3**	**1,2**	**4,2**	**3,7**
Autres	**8,8**	**14,8**	**4,6**	**5,7**	**2,7**	**2,7**
Total des bactériémies	**944**	**156**	**304**	**1165**	**1536**	**2022**

SCN : staphylocoque à coagulase négative.
[1] Melvin MP, et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s : a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 1997 ; 24 : 584–602.
[2] Panceri ML, et al. Aetiology and prognosis of bacteremia in Italy. *Epidemiol Infect* 2004 ; 132 : 647–54.
[3] Bouza E, et al. Report of ESGNI-001 and ESGNI-002 studies. Bloodstream infectious in Europe. *Clin Microbiol Infect* 1999 ; 5 : 2S1-2S12.
[4] Hadziyannis AS, et al. Blood culture results during the period 1995–2002 in a greek tertiary care hospital. *Clin Microbiol Infect* 2004 ; 10 : 657–78.
[5] CHU Dupuytren de Limoges, chiffres pour l'année 2005.
[6] CHU Dupuytren de Limoges, chiffres pour l'année 2010.

le clinicien, ce d'autant plus que les germes isolés (dans certains cas *Staphylococcus aureus* et souvent staphylocoques à coagulase négative, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. et *Propionibacterium* spp.) appartiennent généralement à la flore cutanée et/ou environnementale. Par conséquent, la réalisation d'une hémoculture unique devrait être bannie de la pratique clinique puisque son interprétation en cas de positivité est très délicate. Ce problème se rencontre aussi lorsque le patient est porteur de matériel étranger, cathéter et prothèse, puisque des staphylocoques à coagulase négative, particulièrement *Staphylococcus epidermidis*, sont majoritairement isolés d'hémocultures.

Des hémocultures polymicrobiennes peuvent être rencontrées dans certaines circonstances et sur certains terrains ; c'est le cas pour les patients immunodéprimés (cirrhose, cancer colique, dysimmunité, etc.), au cours d'infections cutanées (brûlures, escarres, etc.) ou chez des patients ayant subi une chirurgie abdominale avec effraction. Dans ces situations, les germes retrouvés dans les hémocultures sont le reflet de ceux retrouvés localement au niveau du pus.

Il faut rappeler que, chez les patients au stade d'agonie, il n'est pas rare d'observer le passage de germes dans la circulation sanguine par rupture des barrières, sans que ces germes aient une signification clinique (chapitre 10).

Toutes les souches isolées d'hémocultures doivent faire l'objet d'une identification et d'un antibiogramme. En cas de doute sur l'identité de plusieurs isolats, une étude moléculaire doit être réalisée afin de déterminer s'il s'agit bien du même clone.

Tout germe qui sera isolé d'une hémoculture devra être conservé dans une souchothèque à –80 °C.

Hémocultures négatives

Les hémocultures négatives signent le plus souvent une absence réelle de bactéries dans le sang. Cependant, devant un contexte clinique évocateur de sepsis, d'endocardite infectieuse ou de tout autre syndrome infectieux, il faut toujours penser à une fausse négativité. Les causes d'échec de cultures sont nombreuses : prélèvement effectué au moment non optimal, trop tardivement au cours de la maladie ; prélèvement pratiqué sous antibiothérapie ; quantité insuffisante de sang ensemencé ; infection localisée sans bactériémie ; micro-organisme de culture impossible, ou enfin origine non bactérienne.

Des repiquages négatifs d'hémocultures peuvent aussi être dus à un micro-organisme de culture difficile, le choix des conditions de subcultures n'étant pas adapté et/ou le temps de culture trop court. En effet, pour certains micro-organismes ayant des exigences nutritives particulières, les subcultures pourront se faire sur des milieux différents et en atmosphère adaptée en fonction de la morphologie et du contexte clinique, notamment pour les bactéries comme *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp., les bactéries du groupe HACEK, ou des bactéries anaérobies. Les subcultures seront alors conservées au minimum 4 jours et traitées comme recommandé ultérieurement dans les chapitres correspondants. Il en est de même pour les streptocoques déficients, *Abiotrophia* et *Granulicatella*, qui nécessitent du pyridoxal ou de la cystéine pour leur croissance. Ils se caractérisent par une croissance en flacon d'hémoculture et une absence de croissance en milieu gélosé normal. En revanche, ces bactéries pousseront sur milieu gélosé additionné de pyridoxal ou de cystéine, ou en satellitisme autour d'une strie de *S. aureus*.

Examens complémentaires

Autres prélèvements

Le biologiste doit rechercher si, parmi les autres prélèvements reçus pour le même patient (LCR, autres liquides de ponctions, pus, urines, etc.), un autre isolat a été obtenu afin de le comparer aux souches isolées à partir des hémocultures. De même, il doit comparer l'isolat au résultat d'une recherche d'antigène positive. Il faut rappeler que les hémocultures sont très rentables et conseillées dans un contexte de méningite ou de pneumopathie où la recherche d'une antigénurie pneumococcique ou de légionelle peut être contributive.

Sérologie

La sérologie peut être utilisée en complément des hémocultures, notamment quand celles-ci sont négatives. Elle permet de diagnostiquer des bactériémies à germes difficilement cultivables comme *Brucella* spp. et *Legionella* spp., mais aussi à germes intracellulaires ou non cultivables en laboratoire de routine, comme *C. burnetii*, avec recherche d'antigènes de phases I et II, *Bartonella* spp., ainsi que *Chlamydia psittaci*. En effet, une sérologie positive chez des patients présentant des signes de septicémie avec des hémocultures négatives permet un diagnostic étiologique.

Techniques de biologie moléculaire

Plusieurs techniques de biologie moléculaire peuvent être utilisées pour aider au diagnostic des septicémies à hémocultures négatives. L'amplification génique (PCR) de fragments internes aux gènes codant pour l'ARN 16S, associée à la détermination de sa séquence nucléotidique du fragment obtenu, ou pour un gène spécifique sont les plus utilisées pour la recherche et l'identification de germes à partir de sérum ou de sang total. Ces techniques permettent notamment d'identifier les germes non cultivables comme *C. burnetii* et *Bartonella* spp., mais aussi *Tropheryma whipplei* ou des germes devenus incultivables du fait d'une antibiothérapie prolongée préalablement. Il est à noter qu'actuellement la biologie moléculaire est peu recommandée sur sang total du fait de la présence de nombreux inhibiteurs qui peuvent rendre le résultat faussement négatif.

Néanmoins, certains fabricants proposent des kits pour la détection d'ADN de bactéries et de champignon directement dans le sang par biologie moléculaire en cas de suspicion de sepsis. Des études de faisabilité ainsi que de sensibilité et spécificité sont nécessaires afin d'évaluer ces différents kits.

Bactériémies à point de départ de dispositif intravasculaire

Les cathéters et chambres implantables vont pouvoir être contaminés par de la flore commensale, le plus souvent cutanée, car ils ont une localisation plus ou moins externe, qui pourra être à l'origine d'une infection localisée ou systémique. Une infection sur cathéter peut aussi être la conséquence d'une contamination par voie endoluminale lors de la manipulation des connexions aux lignes de perfusion, parfois multiples; l'infection est dans ce cas le plus souvent due à des bactéries manuportées par le personnel soignant.

Ce sont les staphylocoques, bactéries commensales de la peau, qui seront le plus souvent incriminés (Fig. 13.4 et Tableau 13.2). Les complications sont plus fréquentes avec *Candida* spp., *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

De nombreuses souches de staphylocoques possèdent la capacité de produire du biofilm, ce qui leur permet d'adhérer plus facilement à du matériel.

Prélèvements

Tout matériel sera prélevé avec précaution et acheminé au laboratoire dans un récipient stérile.

Dans le cas des infections sur dispositifs intravasculaires, si le matériel suspecté est laissé en place, il est nécessaire de pratiquer en parallèle des hémocultures prélevées sur le cathéter et des hémocultures prélevées en périphérie. Des systèmes d'hémocultures quantitatives comme le système Isolator® ont été décrits pour diagnostiquer une infection sur cathéter. Une infection sur cathéter est alors considérée comme significative si la numération microbienne dans l'échantillon sanguin prélevé sur cathéter est 5 fois supérieure à celle dans l'échantillon sanguin périphérique. Mais ces systèmes sont coûteux et assez complexes à utiliser en routine. Une autre approche, très utilisée en routine, est possible si les hémocultures sont analysées par un automate. En effet, il a été montré qu'en cas d'infection sur cathéter, les hémocultures prélevées au même moment et sur cathéter se

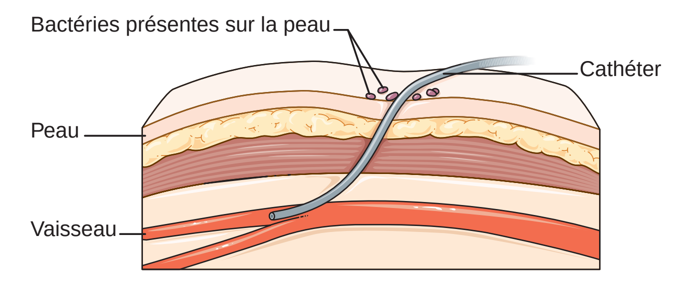


Fig. 13.4 Schéma d'introduction d'un cathéter.

Tableau 13.2 Micro-organismes associés aux infections sur cathéters (fréquence d'après différentes enquêtes).

Micro-organismes ou aspect bactérien	Fréquence
Staphylocoques à coagulase négative	25–40 %
Staphylococcus aureus	5–19 %
Enterococcus spp.	3–11 %
Autres Gram positif	1–7 %
Pseudomonas aeruginosa	2–22 %
Entérobacteries	10–25 %
Acinetobacter	1–2 %
Candida spp.	1–12 %

positivent au moins 2 heures plus tôt que celles prélevées en périphérie, à condition que les deux séries d'hémocultures soient prélevées avec le même volume de sang, acheminées au laboratoire et introduites dans l'automate en même temps. Le temps de positivité est relié à l'inoculum bactérien dans le sang. Cette technique a permis de faire le diagnostic d'une infection sur cathéter en le laissant en place, ce qui est important pour des cathétérisations au long cours, comme pour des patients d'oncologie et d'hématologie où c'est surtout la partie endoluminale qui est concernée, alors que lors des premiers jours, c'est la colonisation de surface à partir de la peau qui est prépondérante.

S'il y a ablation du matériel, on respecte des modalités particulières de mise en culture selon que les cathéters sont longs ou courts. Pour les chambres implantables, on pourra analyser le cathéter, avec un écouvillonnage externe de la chambre, un écouvillonnage de la loge, voire utiliser un produit de rinçage pour la partie fermée.

L'analyse bactériologique des cathéters et des chambres n'est pas systématiquement utile lors du retrait, mais doit être réservée en cas de signes locaux et/ou généraux d'infection.

D'autres techniques ont été proposées pour étudier les infections sur cathéter en laissant le cathéter en place, notamment en réalisant un prélèvement sanguin de 50 µl transcathéter. Après traitement chimique et cytocentrifugation, une coloration de Gram, une coloration à l'acridine orange et un examen microscopique sont réalisés sur le culot de centrifugation. Cette méthode a montré de bonnes sensibilité et spécificité.

Transport

Tout matériel sera acheminé rapidement au laboratoire dans un pot stérile.

Démarches du diagnostic direct sur le produit pathologique

En ce qui concerne les cathéters, ce sera la partie distale (4 à 5 cm) qui sera analysée pour les cathéters longs et la totalité de la partie sous-cutanée pour les cathéters courts. Il existe trois techniques d'ensemencement :

- la technique semi-quantitative de Maki qui consiste à faire rouler le segment de cathéter (5 cm) sur une gélose au sang (Fig. 13.5). Après incubation à 37 °C en atmosphère enrichie en CO_2, le nombre d'unités formant colonies (UFC) sera déterminé. La colonisation est considérée comme significative si la numération est ≥ 15 UFC ;
- la technique de Cléri qui consiste à désobstruer la lumière du segment de cathéter à analyser avec 1 ml de sérum physiologique stérile. Une aliquote sera ensemencée à l'öse calibrée (10 µl) sur une gélose au sang. Après incubation à 37 °C en atmosphère enrichie en CO_2, le nombre d'UFC sera déterminé, 1 colonie correspondant à 10^2 UFC/ml. La colonisation est considérée comme significative si la numération est ≥ 10^3 UFC/ml ;
- la technique quantitative de Brun-Buisson qui est dérivée de la méthode de Cléri et qui consiste à recueillir le segment de cathéter à analyser dans 1 ml de sérum physiologique stérile sans désobstruction. Après agitation au vortex, une aliquote sera ensemencée à l'öse calibrée (10 µl) sur une gélose au sang. Après incubation à 37 °C en atmosphère enrichie en CO_2, le nombre d'UFC sera déterminé, 1 colonie correspondant à 10^2 UFC/ml. La colonisation est considérée comme significative si la numération est ≥ 10^3 UFC/ml. Une sonication du cathéter dans un bouillon est aussi possible avant ensemencement de la gélose au sang.

Des flacons d'hémocultures peuvent être ensemencés, notamment à partir des chambres implantables qui auront été préalablement déchargées dans du sérum physiologique stérile.

Seront ensemencés au moins :

- une gélose au sang incubée en aérobiose ;
- une gélose chocolat incubée sous CO_2 pour les bactéries de culture difficile ;
- une gélose au sang incubée en anaérobiose ;
- un milieu liquide permettant la recherche d'anaérobies (Schaedler, Rosenow, etc.).

Peuvent être ajoutées :

- une gélose au sang sélective type ANC incubée sous CO_2 ;
- une gélose simple incubée en aérobiose pour la culture de bactéries à Gram négatif type CLED, BCP, etc.

Interprétation

Étant donné la diversité des localisations, tout prélèvement doit être correctement identifié en précisant le siège, l'heure de prélèvement et des renseignements cliniques indispensables pour aider le bactériologiste dans sa démarche diagnostique.

En cas d'infection sur dispositif intravasculaire, la décision de retrait du matériel dépend des micro-organismes en cause (quasi systématiquement en cas de *Candida* spp., plus discuté en cas de *S. aureus* et *Pseudomonas*), de la présentation clinique et du risque de complication (si le patient porte une prothèse articulaire ou endovasculaire).

Pour les cathéters, une culture polybactérienne n'est souvent pas significative et correspond plus à une contamination par de la flore commensale.

Au total, la réalisation des prélèvements, le traitement des flacons d'hémocultures et l'interprétation des résultats constituent un tout nécessitant des précautions tout au long de la chaîne, une négligence initiale (souillure) pouvant

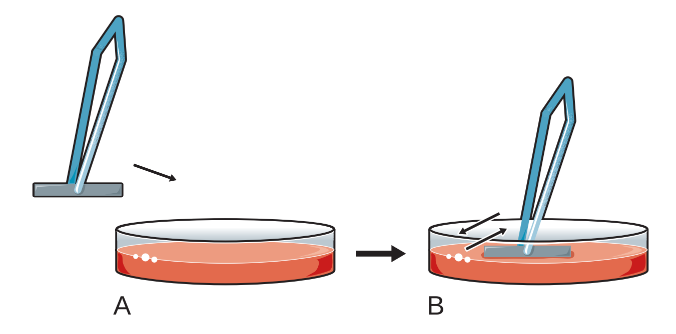


Fig. 13.5 Technique d'ensemencement des cathéters de Maki. **A.** À l'aide d'une pince stérile, déposer le cathéter sur la gélose. **B.** Faire rouler le cathéter 4 fois sur la gélose.

compromettre un diagnostic et orienter vers une fausse piste. Le diagnostic des bactériémies et des septicémies est essentiel dans un laboratoire de bactériologie, les hémocultures permettant le plus souvent d'isoler et d'identifier l'agent responsable et d'orienter le choix de l'antibiothérapie grâce à l'antibiogramme, voire à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) directement ou par E-test. Cet examen est primordial, car bon nombre de septicémies engagent le pronostic vital et seul un traitement approprié institué rapidement permet d'améliorer le pronostic. La négativation des cultures constitue également un élément non négligeable pour apprécier l'efficacité du traitement.

13.2 Endocardites

Introduction

L'endocardite infectieuse (EI) est une maladie sévère, toujours associée à une mortalité importante malgré les avancées de la prise en charge chirurgicale et les progrès des traitements anti-infectieux. Cette infection reste peu fréquente, avec une incidence annuelle standardisée sur l'âge et le sexe de 31 cas/an/million d'habitant, pour la France métropolitaine [1]. Cette incidence est restée stable au cours de ces dernières années, comme l'ont montré les études [1–6], malgré une amélioration de la prise en charge [7] et la pratique de l'antibioprophylaxie pour les gestes à risque. Ce paradoxe est expliqué par l'évolution des facteurs de risque d'EI. Si les facteurs prédisposants classiques, comme les valvulopathies postrhumatismales, ont été éradiqués dans les pays industrialisés, de nouveaux facteurs ont vu le jour. Ceux-ci incluent : les dégénérescences sclérotiques des valves cardiaques, expliquant la fréquence de survenue d'EI dans la tranche d'âge de 70–80 ans [1], l'augmentation de la pose de prothèses valvulaires cardiaques liée aux dégénérescences des valves, la toxicomanie intraveineuse et l'augmentation des EI iatrogènes et nosocomiales [8].

Durant les 40 dernières années, des modifications significatives sont survenues dans la microbiologie des EI : augmentation de la fréquence d'isolement des staphylocoques, en particulier *Staphylococcus aureus* [6, 8], mais également des staphylocoques à coagulase négative, et émergence de certaines espèces de streptocoques comme *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (ex-*S. bovis* biotype 1). Les nouvelles techniques de diagnostic microbiologique ont permis de faire diminuer la proportion d'EI d'étiologie indéterminée et ont ainsi contribué à l'amélioration de la prise en charge de la maladie. Ces techniques ont permis de confirmer le rôle important des bactéries intracellulaires dans cette pathologie, comme *Coxiella burnetii* (Fig. 13.6C), et de mettre en évidence de nouveaux pathogènes, comme les *Bartonella* spp. (Fig. 13.6A,B) et *Tropheryma whipplei*.

Micro-organismes

Il est classique de distinguer deux cadres nosologiques : les EI à hémocultures positives et les EI à hémocultures négatives.

Endocardites à hémocultures positives

Lors de l'enquête épidémiologique faite en France en 2008, le diagnostic d'EI était fait par hémoculture dans environ 91 % des cas [6]. Les *Streptococcaceae* occupaient la première place

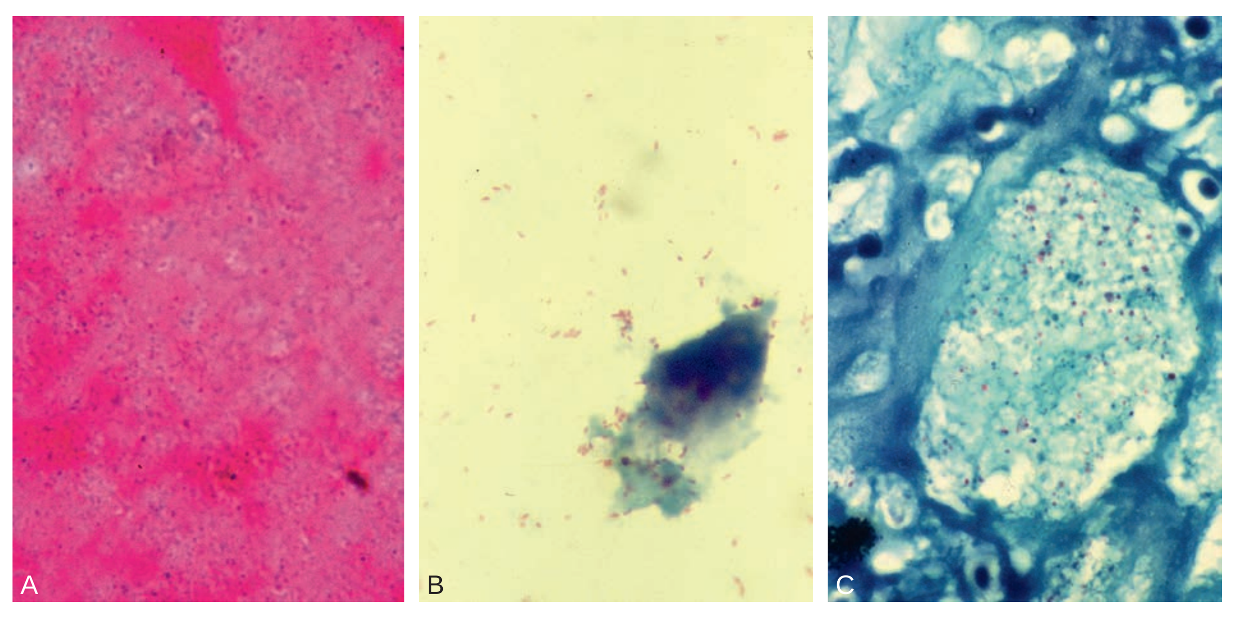


Fig. 13.6 Colorations effectuées sur des valves cardiaques. A. *Bartonella quintana* sur une coupe anatomopathologique d'une valve aortique (coloration de Gram (×100) montrant la présence de petits bacilles à Gram négatif. **B.** *Bartonella quintana* dans une hémoculture (coloration de Gimenez (×100) montrant la présence de petits bacilles apparaissant colorés en rose sur un fond bleu-vert. **C.** *Coxiella burnetii* sur une coupe anatomopathologique d'une valve aortique (coloration de Gimenez (×100) montrant la présence de coccobacilles apparaissant colorés en rose sur un fond bleu-vert.

des agents infectieux responsables d'EI et représentaient un peu moins de 50 % de l'ensemble des micro-organismes (Encadré 13.1) [1, 4]. Les streptocoques oraux (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, etc.) étaient stables, responsables de 19 % des cas d'EI. La participation des streptocoques du groupe D (*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, ex-*S. bovis* biotype 1) était de 13 % en 2008. Il faut noter que ces micro-organismes représentaient 25 % des cas d'EI en 1999. Cette variabilité dans le temps de l'incidence des EI à streptocoques du groupe D pourrait être entre rapport avec un phénomène cyclique actuellement mal compris. La proportion importante de *S. gallolyticus* dans les cas d'EI s'explique dans tous les cas par deux phénomènes : un âge moyen de survenue plus tardif de l'EI, l'association étroite entre une endocardite à *S. gallolyticus* et la survenue de tumeurs du tube digestif. La place des entérocoques est quant à elle stable, aux alentours de 11 %; les portes d'entrées de ces micro-organismes, lorsqu'elles sont trouvées, sont le plus souvent urinaires. Dans la dernière enquête française, *Staphylococcus aureus* occupait la première étiologie bactérienne des EI, représentant plus d'un quart (27 %) des micro-organismes responsables de cette pathologie [6]. Dans d'autres études et dans de nombreux pays, ce micro-organisme représente également souvent le germe le plus fréquemment isolé. Les staphylocoques à coagulase négative (10 %), quant à eux, sont essentiellement responsables d'EI survenant sur prothèse cardiaque.

En 1999, l'analyse comparative des principales caractéristiques des EI dues aux streptocoques oraux, streptocoques du groupe D (essentiellement *S. gallolyticus*) et *Staphylococcus aureus*, avait montré que l'âge moyen était significativement plus élevé pour les EI dues aux streptocoques du groupe D et que les patients ayant une EI à streptocoques du groupe D ou à *S. aureus* avaient par ailleurs moins souvent une cardiopathie sous-jacente connue. Les EI à *S. aureus* avaient une létalité plus importante et un recours à une intervention chirurgicale moins fréquente [1].

Endocardites à hémocultures négatives

Cette entité représente selon les études 1,1 à 55 % des EI [6–13]. Cette large variation est due principalement aux différences dans les critères utilisés pour définir l'EI, à l'interprétation du résultat des hémocultures, ainsi qu'à l'écart dans les techniques utilisées pour mettre en évidence les micro-organismes. Aujourd'hui, grâce à l'amélioration des milieux d'hémocultures, la proportion des EI à hémocultures négatives a été réduite et se situe autour de 10 % [13] (Encadré 13.2). De plus, de nouvelles techniques diagnostiques sérologiques et moléculaires ont permis, depuis une vingtaine d'années, de mettre en évidence certains micro-organismes difficiles ou impossibles à identifier grâce aux hémocultures et ont permis de faire diminuer le nombre d'EI sans agent pathogène identifié autour de 5 %.

La cause principale des EI à hémocultures négatives est l'EI « décapitée » par un traitement antibiotique préalable à la réalisation d'hémocultures, situation qui demeure hélas trop fréquente. Les EI causées par des bactéries de culture fastidieuse ou lente sont la deuxième cause d'EI à hémocultures négatives [14].

Ces bactéries sont dominées par *Coxiella burnetii* (Fig. 13.6C) qui a un métabolisme intracellulaire obligatoire

Encadré 13.1 Micro-organismes responsables d'endocardite infectieuse en France en 2008 [6]

- Streptococcaceae : 48 %
  - Streptocoques du groupe D (*S. bovis* biotype 1; *S. gallolyticus*) : 13 %
  - Streptocoques oraux : 19 %
  - Entérocoques : 11 %
- Staphylococcaceae : 48 %
  - *Staphylococcus aureus* : 27 %
  - Staphylocoques à coagulase négative : 10 %
  - Hémocultures négatives : 9 %
  - Absence de micro-organisme identifié : 5 %

Encadré 13.2 Principales étiologies des endocardites à hémocultures négatives

- Hémoculture négativée par une antibiothérapie préalable
- Bactéries à croissance difficile : HACCEK, streptocoques déficients (*Abiotrophia* spp. et *Granulicatella* spp.), *Brucella* spp., *Bartonella* spp.
- Agents fongiques : *Candida* spp., *Aspergillus* spp.
- Micro-organismes non cultivables sur milieu usuel : *Coxiella burnetii*, *Tropheryma whipplei*, *Legionella* spp., *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp., *Mycobacterium* spp.

et qui se multiplie et vit dans les phagolysosomes des cellules infectées à pH < 5. Cette bactérie, responsable de zoonose, représente 3 à 5 % de l'ensemble des EI et atteint majoritairement les patients ayant une valvulopathie préexistante (88,5 % des cas) [15, 16].

Les bactéries du genre *Bartonella* ont également été reconnues comme agent d'EI à hémocultures négatives. Ces endocardites sont majoritairement dues à *B. henselae* et *B. quintana*, avec une prédominance de *B. quintana* [17, 18]. Ces bactéries à Gram négatif (Fig. 13.6A), intracellulaires facultatives, représentent 3 % des EI. *B. quintana* est transmis essentiellement par les poux de corps alors que *B. henselae* est transmis à l'homme par morsure ou griffure de chat ou par les puces de chat. Certaines caractéristiques épidémiologiques permettent de distinguer les deux types d'EI; l'un, causé par *B. quintana*, survient principalement chez les patients sans valvulopathie préalablement connue, alcooliques et souvent sans domicile fixe et exposés aux poux de corps; et le second, dû à *B. henselae*, est rencontré chez des patients ayant une valvulopathie sous-jacente souvent en contact avec des chats.

La responsabilité de *Tropheryma whipplei* comme agent responsable d'EI à hémocultures négatives a été montrée après isolement et culture de la bactérie d'une valve cardiaque en 2000 [19]. Plusieurs études ont souligné la possibilité de survenue d'une atteinte isolée de l'endocarde par cet agent pathogène avec une absence des autres localisations classiques, en particulier digestives, de la maladie de Whipple [20, 21]. Grâce à la biologie moléculaire et en particulier au développement de PCR spécifique de *T. whipplei*, il a été noté une augmentation des cas d'EI imputables à ce micro-organisme au cours de ces dernières années.

Enfin, parmi les autres bactéries pouvant être responsables d'EI à hémocultures négatives, les bactéries du groupe HACCEK (*Haemophilus* spp., *Actinobacillus actinomycetem commitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens*, *Kingella kingae*) de la cavité oropharyngée sont les plus nombreuses (environ 2 à 3 %). Elles sont caractérisées par une croissance parfois difficile rendant compte d'un délai plus long pour leur mise en évidence au laboratoire, mais qui a été cependant nettement raccourci avec l'amélioration des milieux d'hémocultures.

Une place à part est représentée par les endocardites fongiques. En effet, si les espèces de *Candida* et d'*Aspergillus* sont rarement responsables d'EI, elles doivent être systématiquement évoquées dans les endocardites postopératoires, sur prothèses cardiaques, ou survenant chez le toxicomane [22].

Nature des micro-organismes sur valves prothétiques versus valves natives

Les endocardites sur prothèses cardiaques survenant dans la première année après l'acte opératoire sont le plus souvent dues aux staphylocoques à coagulase négative introduits au moment de la chirurgie. Les micro-organismes responsables d'EI survenant à plus d'un an de la chirurgie se rapprochent de ceux responsables d'EI sur valve native.

Physiopathologie

Généralités

L'événement primaire dans la survenue d'EI est représenté par l'adhérence bactérienne sur l'endocarde de valves cardiaques lésées au cours d'une bactériémie, même transitoire. Si des gestes médicochirurgicaux invasifs peuvent engendrer un passage sanguin de certaines bactéries, certains gestes de la vie courante (mastication, brossage de dents, etc.) engendrent également des bactériémies transitoires rendant compte de la fréquence des EI survenant en l'absence de gestes à risque. L'adhérence bactérienne fait intervenir des facteurs tissulaires valvulaires et des facteurs bactériens. La deuxième étape dans la survenue d'EI consiste en la persistance et en la multiplication des bactéries au niveau de l'endocarde associées le plus souvent à une extension locale responsable de dégâts valvulaires. La troisième étape est représentée par la dissémination des micro-organismes dans les différents organes (rate, cerveau, rein, os, etc.) à l'occasion d'embolies septiques.

Adhérence aux tissus valvulaires lésés

Des lésions inflammatoires ou mécaniques des valves conduisent à la colonisation bactérienne au cours des bactériémies [7].

En réponse à une inflammation locale, les cellules endothéliales expriment différentes protéines, en particulier des intégrines [7, 23], qui lient la fibronectine plasmatique à la surface des cellules endothéliales, permettant l'adhésion des bactéries grâce à leur récepteur à la fibronectine. Une fois cette étape accomplie, les bactéries sont internalisées. En réponse à cette invasion, les cellules produisent différentes substances, en particulier des cytokines qui induisent l'agrégation de plaquettes, de fibrine et de cellules monocytaires conduisant à la formation des végétations. Ces phénomènes inflammatoires seraient responsables de la fréquence importante des EI à *S. aureus* chez des patients sans valvulopathie préexistante ou chez les patients toxicomanes par injection de substances impures.

Les lésions mécaniques engendrent une altération de l'endothélium et entraînent la mise en contact des éléments sanguins avec les composants sous-endothéliaux, aboutissant à la formation d'un coagulum. Ce coagulum, contenant du fibrinogène, de la fibrine et des plaquettes, constitue l'endocardite thrombotique non bactérienne. La colonisation bactérienne a lieu secondairement au cours d'une bactériémie. Cette colonisation engendre la production de cytokines responsable de l'augmentation du coagulum infecté donnant naissance à la végétation.

Rôle des facteurs bactériens

Les principales espèces bactériennes responsables d'EI possèdent des adhésines bactériennes favorisant la colonisation, appelées MSCRAMMS (*microbial surface component reacting with adhesive matrix molecules* [24]) comme le récepteur au fibrinogène, à la fibronectine ou les exopolysaccharides.

Survie des bactéries in situ

Après colonisation, les bactéries peuvent survivre et échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. Les souches isolées d'EI sont résistantes à des facteurs plaquettaires, en particulier au facteur microbicide plaquettaire [25], et également résistantes aux facteurs humoraux, comme le complément, ainsi qu'à différents facteurs cellulaires.

Dissémination

La dissémination est favorisée par différentes exo-enzymes et exotoxines responsables des dégâts valvulaires locaux. Ces phénomènes aboutissent à un dysfonctionnement valvulaire par extension de l'infection, formation d'abcès septal et myocardique et, à terme, insuffisance cardiaque. La fragmentation de végétations est responsable d'emboles septiques ou non septiques. L'essaimage de micro-organismes rend compte de foyers septiques secondaires. Le relargage d'antigènes entraîne la formation de complexes immuns circulants et les phénomènes cliniques et biologiques de vascularite. Enfin, des dilatations de la paroi artérielle (anévrismes mycotiques) peuvent survenir et se rompre, responsables d'hémorragies.

Diagnostic

Si en théorie le diagnostic d'EI repose sur l'association d'une bactériémie persistante et de lésions histologiques des valves cardiaques, des critères plus cliniques, échographiques et microbiologiques ont été proposés [26, 27]. Ces critères modifiés de Duke ont permis d'améliorer la sensibilité du diagnostic d'EI sans perdre en spécificité et sont maintenant largement utilisés dans les études épidémiologiques.

La mise en évidence du germe responsable d'EI reste une des pierres angulaires du diagnostic et de la thérapeutique des EI. De nombreux «outils» sont maintenant disponibles et des recommandations microbiologiques et anatomopathologiques ont été faites pour améliorer le diagnostic [13, 28]. Elles concernent les hémocultures, les sérologies, la mise en culture du sang sur culture cellulaire, l'utilisation de techniques de biologie moléculaire, et les techniques microbiologiques et anatomopathologiques d'études des valves et prothèses cardiaques.

Hémocultures

Lors des endocardites, une bactériémie est constante, ce qui permet de réaliser des hémocultures quelle que soit la température du patient. Des informations cliniques pertinentes avec la mention «suspicion d'EI» doivent être indiquées au laboratoire.

Nombre et type d'hémocultures

En l'absence de traitement antibiotique dans les jours précédents et grâce à l'amélioration des milieux d'hémocultures, une série de trois hémocultures aérobies et anaérobies dans un intervalle de 24 heures espacées au minimum de 1 heure sont suffisantes [28–30]. En cas d'urgence thérapeutique, les hémocultures peuvent être prélevées à 30 minutes d'intervalle. Pour les principaux agents responsables d'EI, les deux premières hémocultures sont positives dans plus de 90 % des cas. L'amélioration des milieux d'hémocultures rend compte également de l'isolement fréquent actuellement de *Candida* spp. au cours des EI fongiques. Si les trois premières hémocultures recommandées sont négatives après 48 à 72 heures d'incubation, une deuxième série d'examens doit être réalisée (Encadré 13.3). Ces investigations incluent la pratique d'une série de trois nouvelles hémocultures en diversifiant si possible les milieux : flacons contenant des résines absorbantes ou du charbon pour inhiber l'action des antibiotiques en cas d'antibiothérapie antérieure, hémocultures de type lyse-centrifugation pour favoriser la croissance de germes exigeants en culture. Dans beaucoup d'hôpitaux, des systèmes de détection automatisée des hémocultures sont maintenant utilisés avec des flacons contenant des résines captant les antibiotiques.

Durée d'incubation

Il est toujours recommandé de prolonger la durée d'incubation pour une durée ≥ 15 jours pouvant aller jusqu'à 4 semaines, même si, avec l'amélioration des milieux d'hémocultures, le gain d'une incubation prolongée puisse apparaître plus faible que par le passé [31].

Sérologie

Si les trois premières hémocultures recommandées sont négatives après 48 à 72 heures d'incubation, il est justifié de réaliser des examens complémentaires comprenant au minimum des sérologies pour *Coxiella burnetii* et *Bartonella* spp. Pour *Coxiella burnetii*, en utilisant la technique de référence en immunofluorescence, un titre d'anticorps en IgG antiphase 1 ≥ 800 associé à un taux d'anticorps en IgA ≥ 100 est hautement prédictif et sensible, avec une sensibilité de 100 % et une valeur prédictive positive de 98 % [32]. Pour *Bartonella*, un titre d'IgG ≥ 800 avec la technique d'immunofluorescence est associé à une valeur prédictive positive de 95,5 % en faveur de la responsabilité de *Bartonella* en cas d'EI [17]. En fonction du contexte épidémiologique, d'autres sérologies pour des agents responsables d'EI à hémocultures négatives peuvent être demandées : *Brucella* spp., *Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae, Candida* spp. et *Aspergillus* spp. (Encadré 13.3).

PCR sanguine

Deux techniques de réaction de PCR peuvent être utilisées sur sang en fonction du contexte, une PCR ayant pour cible un gène commun à toutes les bactéries, le gène qui code l'ARN ribosomal 16S, ou une PCR spécifique d'une espèce bactérienne en cas d'orientation diagnostique, par exemple établie sur la sérologie [33]. Il faut cependant noter que la PCR 16S est moins sensible à partir de sang que de matériel valvulaire et qu'il est raisonnable de l'envisager en cas de négativité des autres investigations (Encadré 13.3). Très récemment, des techniques de PCR en temps réel sur sérum pour *Coxiella burnetii, Bartonella* et *T. whipplei* ont permis de montrer une sensibilité comprise entre 58 et 65 % pour le diagnostic. Ces techniques ne sont cependant actuellement pratiquées que par certains laboratoires. La PCR spécifique de l'agent de la fièvre Q n'apporterait pas de bénéfice diagnostique par rapport aux techniques sérologiques ; en revanche, les PCR *Bartonella* et *T. whipplei* peuvent être

Encadré 13.3 Stratégie diagnostique en cas de suspicion d'endocardite infectieuse à hémocultures négatives (d'après [13])

- Dans les 24 premières heures :
  - 3 hémocultures (flacons aérobies et anaérobies) ; avertir le laboratoire de la suspicion d'EI
- Si les hémocultures sont négatives après 48 heures d'incubation, investigation EI à hémocultures négatives :
  - 3 nouvelles hémocultures utilisant des résines captant les antibiotiques (ou les systèmes de lyse-centrifugation)
  - sérologies pour *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp.
  - facteurs rhumatoïdes et anticorps antinucléaires
- Si négatif :
  - 1 tube de sang EDTA pour PCR spécifique *Bartonella* spp. et *T. whipplei*, *Coxiella burnetii* et PCR ARN 16S et 18S
- Si négatif :
  - autres sérologies : *Chlamydia* spp., *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Legionella* spp., *Brucella* spp. et *Mycoplasma* spp., Western-blot pour *Bartonella* spp.
  - 1 tube de sang hépariné pour cultures cellulaires
- Si intervention chirurgicale, analyses des valves, de végétations, d'emboles :
  - coloration de Gram et de Gimenez
  - cultures prolongées (acellulaires)
  - méthodes moléculaires (PCR ARN 16S et 18S)
  - analyses histologiques avec coloration spéciale (Wharting Starry, PAS, Gimenez, Grocott).

pratiquées sur sang en cas de bilan sérologique négatif, en particulier en l'absence de matériel valvulaire disponible pour analyse microbiologique. Des techniques de PCR fongique à large spectre sur sang peuvent également être réalisées avec une recherche d'ARN fongique 18S [13].

Techniques microbiologiques d'étude des valves cardiaques (Fig. 13.7)

Sur la partie de la végétation ou de la valve excisée destinée à l'anatomopathologie et, avant son envoi, il est recommandé de réaliser trois empreintes sur lames. Une coloration de Gram et une coloration pour la mise en évidence de germes intracellulaires (coloration de Gimenez, coloration de Giemsa ; Fig. 13.7) doivent être effectuées. Le broyat de la partie de la végétation est ensuite mis en culture [28]. Le résidu est congelé à –80 °C pour d'éventuelles études ultérieures (culture sur milieu cellulaire, biologie moléculaire). Les techniques de biologie moléculaire peuvent permettre d'identifier le micro-organisme responsable de l'EI, à condition d'avoir accès à du tissu valvulaire excisé au cours d'une chirurgie cardiaque. La PCR 16S représente actuellement une aide diagnostique importante pour les EI à hémocultures négatives puisqu'elle permet de mettre en évidence le micro-organisme à l'origine de l'infection dans un tiers des cas [20, 34, 35]. Certaines équipes considèrent qu'en cas de matériel valvulaire disponible, la biologie moléculaire doit être privilégiée par rapport à la culture classique en raison de la meilleure sensibilité de cette technique. Les PCR spécifiques de *Coxiella burnetii*, *Bartonella* et *T. whipplei* peuvent également être réalisées à partir de valves cardiaques réséquées, ainsi que la PCR fongique 18S [13].

Étude anatomopathologique des valves cardiaques

En cas de chirurgie cardiaque, l'analyse anatomopathologique des valves cardiaques ou des végétations réséquées

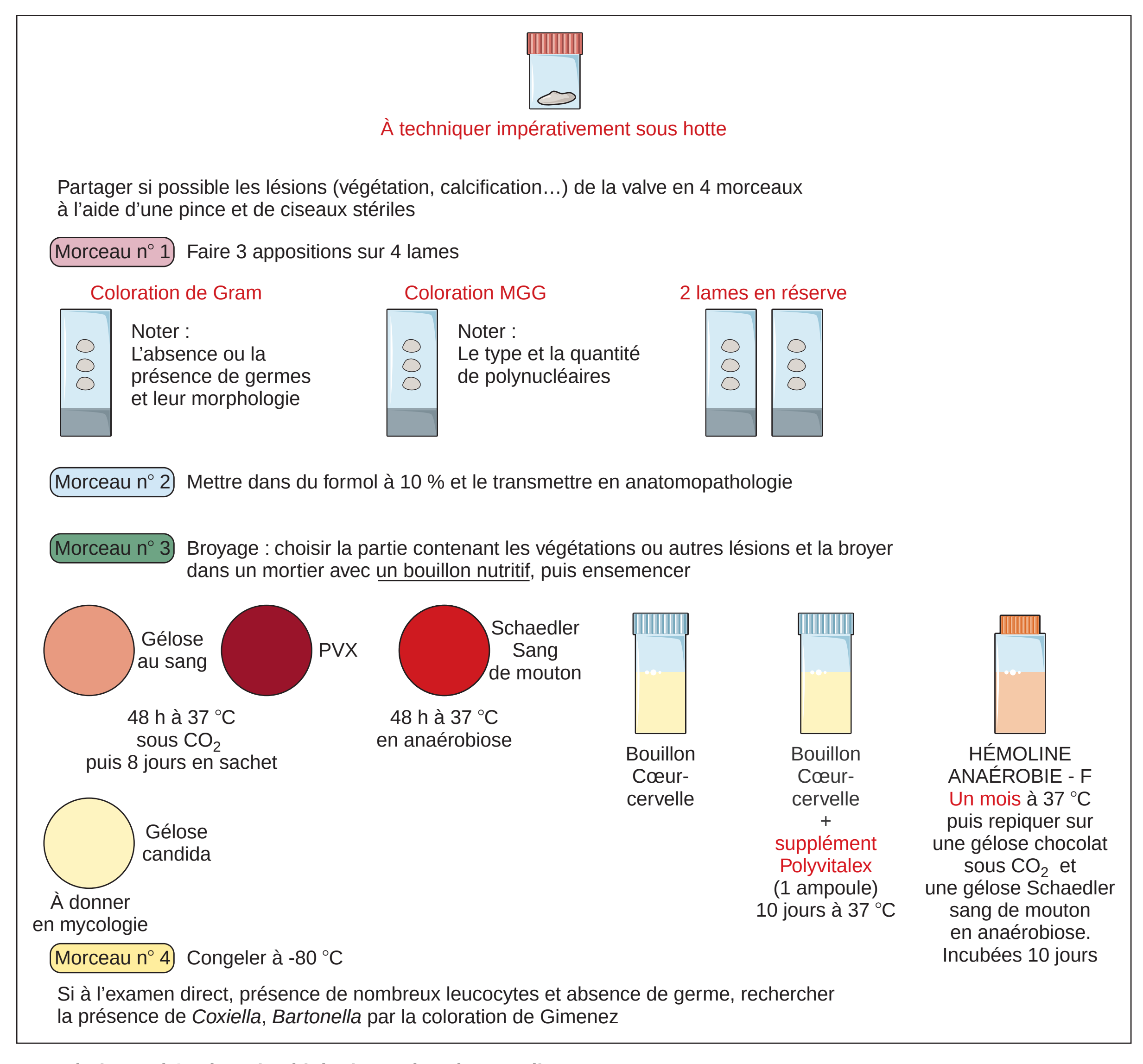


Fig. 13.7 Techniques d'études microbiologiques de valves cardiaques.

doit être systématiquement réalisée en parallèle de l'étude microbiologique afin de confirmer le diagnostic d'endocardite et de mettre en évidence le caractère non infectieux de certaines atteintes de l'endocarde (endocardites de Libmann-Sacks ou marastiques) [13, 28].

Culture du sang sur milieu cellulaire

Cette technique, réservée à des laboratoires spécialisés, peut permettre l'isolement de bactéries intracellulaires obligatoires (*Coxiella burnetii, Tropheryma whipplei*) ou facultatives (*Bartonella* spp.) (Encadré 13.3). Cette technique fastidieuse semble ne pas apporter un bénéfice diagnostique important et doit donc être envisagée si tous les autres moyens diagnostiques sont négatifs. Comme pour la culture du sang sur milieu acellulaire, cette recherche, si elle est réalisée, doit être effectuée avant toute antibiothérapie.

Étude de la sensibilité des micro-organismes aux antibiotiques

Cette étude doit être systématique et interprétée selon les recommandations du CA-SFM [36]. Une détermination de la CMI par la technique d'E-test® ou par une technique de référence est nécessaire pour les antibiotiques utilisés en thérapeutique. L'étude de sensibilité des souches de streptocoques et des entérocoques issues de l'enquête de 1999 [37] a montré que toutes les souches étaient sensibles à la pénicilline ou à l'amoxicilline avec des CMI ≤ 4 mg/l. Des hauts niveaux de résistance aux aminosides étaient observés chez *S. gallolyticus* et *Enterococcus faecalis*. Toutes les souches étaient sensibles aux glycopeptides. Dans cette enquête, il a été noté l'émergence de souches de streptocoques oraux résistantes à l'érythromycine.

Traitement

La prise en charge de l'EI repose essentiellement sur l'éradication des micro-organismes par un traitement anti-infectieux bactéricide. Une prise en charge chirurgicale complémentaire est souvent nécessaire pour exciser les tissus infectés, drainer les abcès ou éliminer un matériel étranger sur lequel un biofilm s'est formé. Par ailleurs, la recherche et l'éradication des portes d'entrée infectieuses en fonction du micro-organisme responsable de l'EI constituent une partie de la prise en charge à ne pas négliger.

Antibiothérapie

L'antibiothérapie doit être bactéricide et prolongée. La nature et la durée de l'antibiothérapie dépendent de plusieurs facteurs incluant la nature du micro-organisme, sa sensibilité aux antibiotiques, la survenue sur valve native ou sur prothèse, l'existence de complications et de tares sous-jacentes (insuffisance rénale). Les anti-infectieux sont administrés par voie parentérale à la phase initiale, et de façon prolongée, en particulier pour les EI sur prothèse valvulaire. Le calcul de la durée de l'antibiothérapie prend en compte le premier jour de traitement anti-infectieux efficace. En cas de remplacement valvulaire avec culture positive de la valve excisée, la durée de l'antibiothérapie est définie à partir du jour de la chirurgie cardiaque. L'utilisation de fortes posologies d'antibiotiques assurant des concentrations sériques élevées est nécessaire pour assurer une diffusion des antibiotiques au sein des végétations. La surveillance par dosage sérique est recommandée afin de suivre l'efficacité du traitement anti-infectieux et de prévenir sa toxicité. La détermination du pouvoir bactériostatique ou bactéricide du sérum n'est plus réalisée.

Les schémas thérapeutiques proposés pour les principaux micro-organismes sont présentés dans les tableaux 13.3, 13.4 et 13.5 adaptés selon les principales recommandations [6, 29, 38, 39]. Les recommandations thérapeutiques récentes ont tendance à réduire la place des aminosides dans le traitement des EI. En raison de la néphrotoxicité potentielle de cette classe thérapeutique, un schéma thérapeutique comprenant une bithérapie courte ou une monothérapie par β-lactamines est actuellement recommandé dans certaines situations (EI à *S. aureus* sur valve native, EI non compliquées à streptocoques) [38].

Chirurgie

Presque la moitié des patients atteints d'EI bénéficient d'une prise en charge chirurgicale associée au traitement anti-infectieux. La décision de traitement chirurgical prend en compte les facteurs de risque d'évolution défavorable et les comorbidités du patient [40]. L'indication et le délai de la chirurgie doivent être discutés dès le début de la prise en charge du patient avec les chirurgiens cardiaques, car certaines situations peuvent nécessiter une prise en charge urgente (< 24 heures). Trois indications majeures conduisent à une chirurgie : la défaillance cardiaque réfractaire au traitement médical, le non-contrôle de l'infection malgré un traitement anti-infectieux adapté, et la prévention d'événements emboliques.

Tableau 13.3 **Traitement antibiotique au cours des endocardites infectieuses (d'après [44]).**

Streptocoques oraux et *S. gallolyticus* sensibles la pénicilline (CMI < 0,125 mg/l)	Pénicilline G ou amoxicilline ± gentamicine	1 mois si β-lactamine seule 15 jours si bithérapie
Streptocoques oraux et *S. gallolyticus* de sensibilité diminuée à la pénicilline (CMI entre 0,125 et 2 mg/l) Streptocoques déficients	Pénicilline G ou amoxicilline ou ceftriaxone + gentamicine	1 mois dont 15 jours de bithérapie
Entérocoques	Amoxicilline + gentamicine	4 à 6 semaines dont 2 à 4 semaines de bithérapie
Allergie à la pénicilline Bactéries de haut niveau de résistance à la pénicilline (*E. faecium*)	Vancomycine ou teicoplanine + gentamicine	

Tableau 13.4 **Traitement antibiotique au cours des endocardites infectieuses (d'après [44]).**

Staphylocoques sensibles à la méticilline	Oxacilline ou cloxacilline + gentamicine	Valve native : 4 à 6 semaines avec 3–5 jours d'aminosides Valve prothétique : 6 semaines avec 2 semaines d'aminosides et ajout de rifampicine
Staphylocoques résistants à la méticilline Ou allergie à la pénicilline	Vancomycine + gentamicine	Valve native : 4 à 6 semaines avec 3–5 jours d'aminosides Valve prothétique : 6 semaines avec 2 semaines d'aminosides et ajout de rifampicine
HACCEK	Ceftriaxone (ou céfotaxime) ± gentamicine ou ceftriaxone ± ciprofloxacine	1 mois si β-lactamine seule 15 jours si bithérapie
Bartonella spp.	Doxycycline per os + gentamicine	4 semaines dont 2 semaines d'aminosides
Coxiella burnetii	Doxycycline + hydroxychloroquine	Variable selon évolution sérologique
Tropheryma whipplei	Doxycycline + hydroxychloroquine	Traitement prolongé 12 à 18 mois

Tableau 13.5 **Traitement antibiotique probabiliste au cours des endocardites infectieuses (avant, ou en l'absence d'identification de pathogène) (d'après [44]).**

Valve native	Amoxicilline + gentamicine ou amoxicilline et acide clavulanique + gentamicine Amoxicilline + oxacilline + gentamicine si choc septique ou sepsis	4 à 6 semaines dont au minimum 2 semaines d'aminosides
Valve prothétique < 1 an	Vancomycine + rifampicine + gentamicine	6 semaines dont 2 semaines d'aminosides
Valve prothétique > 1 an	Comme pour valve native	

Prophylaxie

Les indications et la nature de l'antibioprophylaxie pour les soins dentaires à risque à réaliser en fonction de la nature de la valvulopathie ont été révisées ces dernières années [41–43]. Les dernières recommandations françaises, européennes et américaines concernant la prévention des EI réduisent les indications d'antibioprophylaxie aux seuls patients à haut risque d'EI (porteurs de valves prothétiques, patients ayant des antécédents d'EI ou présentant certaines cardiopathies congénitales). La prophylaxie est recommandée chez ces patients lors des soins dentaires nécessitant une manipulation de la gencive ou de la région périapicale de la dent, ou une perforation de la muqueuse orale. Pour les autres procédures invasives, notamment gastro-intestinales, urologiques ou les explorations respiratoires, une antibioprophylaxie n'est plus recommandée pour aucun groupe de patients.

Conclusion

L'EI est toujours une pathologie infectieuse d'actualité dont l'incidence reste stable malgré la diminution des patients porteurs de valvulopathies postrhumatismales. On observe, en revanche, une modification du profil des patients atteints d'EI due essentiellement à l'augmentation de cette pathologie chez les patients âgés sans cardiopathie antérieure connue et à l'augmentation des endocardites associées aux soins. Depuis quelques années, il a également été noté des modifications de la répartition des micro-organismes en France, avec une place importante prise par *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (ex-*bovis* biotype 1) et les staphylocoques, en particulier *Staphylococcus aureus*. Ces modifications de la microbiologie ont conduit à une réflexion nouvelle sur l'antibioprophylaxie dont les indications ont été réduites. Enfin, la prise en charge thérapeutique a évolué avec une remise en question de l'intérêt des bithérapies initiales prolongées et une place importante prise par la chirurgie qui semble diminuer la létalité hospitalière.

Références

[1] Hoen B, Alla F, Selton-Suty C, et al. Association pour l'Étude et la Prevention de l'Endocardite Infectieuse (AEPEI) Study Group. Changing profile of infective endocarditis : results of a 1-year survey in France. JAMA 2002 ; 288 : 75–81.

[2] Delahaye F, Goulet V, Lacassin F, et al. Characteristics of infective endocarditis in France in 1991. A 1-year survey. Eur Heart J 1995 ; 16 : 394–401.

[3] Hogevik H, Olaison L, Andersson R, et al. Epidemiologic aspects of infective endocarditis in an urban population. A 5-year prospective study. Medicine 1995 ; 74 : 324–39.

[4] Hoen B. Endocardites infectieuses : épidémiologie et approche diagnostique. Rev Med Interne 2007 ; 28(Suppl. 1) : 22–6.

[5] Van der Meer JT, Thompson J, Valkenburg HA, et al. Epidemiology of bacterial endocarditis in The Netherlands. II. Antecedent procedures and use of prophylaxis. Arch Intern Med 1992 ; 152 : 1869–73.

[6] Selton-Sulty C, Célard M, Le Moing V, et al. Preeminence of Staphylococcus aureus in infective endocarditis : a 1-year Population-based survey. Clin Infect Dis 2012 ; 54 : 1230–9.

[7] Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. Lancet 2004 ; 363 : 139–49.

[8] Fowler VG, Miro JM, Hoen B, et al. Staphylococcus aureus endocarditis : a consequence of medical progress. JAMA 2005 ; 293 : 3012–21.

[9] Houpikian P, Raoult D. Blood culture-negative endocarditis in a reference center : etiologic diagnosis of 348 cases. Medicine 2005 ; 84 : 162–73.

[10] Naber CK, Erbel R. Infective endocarditis with negative blood cultures. Int J Antimicrob Agents 2007 ; 30(Suppl. 1) : 32–6.
[11] Hoen B, Selton-Suty C, Lacassin F, et al. Infective endocarditis in patients with negative blood cultures : analysis of 88 cases from a one-year nationwide survey in France. Clin Infect Dis 1995 ; 20 : 501–6.
[12] Werner M, Andersson R, Olaison L, et al. A clinical study of culture-negative endocarditis. Medicine 2003 ; 82 : 263–73.
[13] Fournier PE, Thuny F, Richet H, et al. Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis : a prospective study of 819 new cases. Clin Infect Dis 2010 ; 51 : 131–40.
[14] Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. Clin Microbiol Rev 2001 ; 14 : 177–207.
[15] Maurin M, Raoult D. Q fever. Clin Microbiol Rev 1999 ; 12 : 518–53.
[16] Hartzell JD, Wood-Morris RN, Martinez LJ, et al. Q fever : epidemiology, diagnosis, and treatment. Mayo Clin Proc 2008 ; 83 : 574–9.
[17] Fournier PE, Lelievre H, Eykyn SJ, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of Bartonella quintana and Bartonella henselae endocarditis : a study of 48 patients. Medicine 2001 ; 80 : 245–51.
[18] Raoult D, Fournier PE, Vandenesch F, et al. Outcome and treatment of Bartonella endocarditis. Arch Intern Med 2003 ; 163 : 226–30.
[19] Raoult D, Birg ML, La Scola B, et al. Cultivation of the bacillus of Whipple's disease. N Engl J Med 2000 ; 342 : 620–5.
[20] Fenollar F, Lepidi H, Raoult D. Whipple's endocarditis : review of the literature and comparisons with Q fever, Bartonella infection, and blood culture-positive endocarditis. Clin Infect Dis 2001 ; 33 : 1309–16.
[21] Schneider T, Moos V, Loddenkemper C, et al. Whipple's disease : new aspects of pathogenesis and treatment. Lancet Infect Dis 2008 ; 8 : 179–90.
[22] Pierrotti LC, Baddour LM. Fungal endocarditis, 1995–2000. Chest 2002 ; 122 : 302–10.
[23] Hemler ME, Elices MJ, Parker C, et al. Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. Immunol Rev 1990 ; 114 : 45–65.
[24] Patti JM, Hook M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. Curr Opin Cell Biol 1994 ; 6 : 752–8.
[25] Fowler VG, McIntyre LM, Yeaman MR, et al. In vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in isolates of Staphylococcus aureus from endocarditis patients correlates with an intravascular device source. J Infect Dis 2000 ; 182 : 1251 34.
[26] Durack DT, Lukes AS, Bright DK. New criteria for diagnosis of infective endocarditis : utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service. Am J Med 1994 ; 96 : 200–9.
[27] Li JS, Sexton DJ, Mick N, et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. Clin Infect Dis 2000 ; 30 : 633–8.
[28] Mainardi JL, Vandenesch F, Casalta JP, et al. Recommandations pour le diagnostic microbiologique et l'étude anatomopathologique des valves cardiaques au cours des endocardites infectieuses. Bulletin de la Société Française de Microbiologie 1995 ; 10 : 12–5.
[29] Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, et al. Infective endocarditis : diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications : a statement for healthcare professionals from the committee on rheumatic fever, endocarditis, and Kawasaki disease, council on cardiovascular disease in the young, and the councils on clinical cardiology, stroke, and cardiovascular surgery and anesthesia, American heart association–executive summary : endorsed by the Infectious Diseases Society of America. Circulation 2005 ; 111 : 3167–84.
[30] Bayer AS, Bolger AF, Taubert KA, et al. Diagnosis and management of infective endocarditis and its complications. Circulation 1998 ; 98 : 2936–48.
[31] Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. Clin Infect Dis 2005 ; 41 : 1677–80.
[32] Tissot-Dupont H, Thirion X, Raoult D. Q fever serology : cutoff determination for microimunofluorescence. Clin Diagn Lab Immunol 1994 ; 1 : 189–96.
[33] Podglajen I, Bellery F, Poyart C, et al. Comparative molecular and microbiologic diagnosis of bacterial endocarditis. Emerg Infect Dis 2003 ; 9 : 1543–7.
[34] Gauduchon V, Chalabreysse L, Étienne J, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 763–6.
[35] Greub G, Lepidi H, Rovery C, et al. Diagnosis of infectious endocarditis in patients undergoing valve surgery. Am J Med 2005 ; 118 : 230–8.
[36] Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie Communiqué, 2011, http://www.sfm.asso.fr.
[37] Mihaila-Amrouche L, Schlegel L, Bouvet A, et al. Impact of susceptibility to antibiotics of streptococci and enterococci isolated from patients with infective endocarditis on antibiotic treatment. Indian J Med Res 2004 ; 119(Suppl) : 80–3.
[38] Task force on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis of the European Society of Cardiology, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, International Society of Chemotherapy for Infection and Cancer, et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009) ; the task force on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J 2009 ; 30 : 2369–413.
[39] Wilson WR, Karchmer AW, Dajani AS, et al. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to streptococci, enterococcci, staphylococci and Hacek microorganisms. JAMA 1995 ; 274 : 1706–13.
[40] Delahaye F, Célard M, Roth O, et al. Indications and optimal timing for surgery in infective endocarditis. Heart 2004 ; 90 : 618–20.
[41] Delahaye F, Harbaoui B, Cart-Regal V, et al. Recommendations on prophylaxis for infective endocarditis : dramatic changes over the past seven years. Arch Cardiovasc Dis 2009 ; 102 : 233–45.
[42] Brooks N. Prophylactic antibiotic treatment to prevent infective endocarditis : new guidance from the National Institute for Health and Clinical Excellence. Heart 2009 ; 95 : 774–80.
[43] Prophylaxie de l'endocardite infectieuse. Révision de la conférence de consensus de mars 1992. Recommandations 2002. Med Mal Infect 2002 ; 32 : 542–52.
[44] The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by : European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis. Europ Heart J 2015 ; 36 : 3075–123.

Pour en savoir plus

Blot F, Nitenberg G, Brun-Buisson C. New tools in diagnosing catheter-related infections. Support Care Cancer 2000 ; 8 : 287–92.
Dune Jr WM, LaRocco M. Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections. In : Cimolai N, editor. Blood culture systems. New York–Basel : Marcel Dekker Inc ; 2001. p. 189–209.
Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. Color atlas and texbook of diagnosis microbiology. In : Guidelines for the collection, transport, processing, analysis and reporting of cultures from specific sources. 5th ed. 1997. New York–Philadelphia : Lippincott ; 1997. p. 121–70.
O'Hara et coll., 2003 O'Hara CM, Weinstein MP, Miller JM. Manual of clinical microbiology. In : Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al., editors. Manual and automated systems for detection and identification of micro-organisme. 8th ed. Washington DC : ASM Press ; 2003. p. 185–207.

Diagnostic bactériologique et suivi biologique des méningites bactériennes

P. Mariani-Kurkdjian, S. Bonacorsi, E. Bingen

PLAN DU CHAPITRE

Les méningites infectieuses touchent le système nerveux central avec une atteinte limitée aux méninges par opposition aux méningo-encéphalites touchant le parenchyme cérébral.

Les méningites infectieuses se répartissent en trois groupes : les méningites virales généralement bénignes et d'évolution spontanée favorable, les méningites fongiques, rares et le plus souvent liées à une immunodépression, et enfin les méningites bactériennes.

Parmi les méningites bactériennes, on distingue les méningites communautaires et les méningites iatrogènes généralement associées à un contexte neurochirurgical. L'épidémiologie des méningites communautaires varie selon l'âge du patient (Tableau 14.1). Lors de méningites iatrogènes, les germes en cause sont le plus souvent *Staphylococcus aureus* ou des staphylocoques à coagulase négative, et des bacilles à Gram négatif (entérobactéries ou bacilles non fermentants).

Si le diagnostic de méningite est initialement envisagé sur des arguments cliniques, l'élément décisif pour affirmer une méningite repose sur l'examen du liquide céphalorachidien (LCR). Il s'agit toujours d'un examen d'urgence à traiter le plus rapidement possible.

Tableau 14.1 **Épidémiologie bactérienne des méningites en fonction de l'âge.**

Nouveau-né	Enfants 3 mois–2 ans	Enfant 2 à 15 ans Adulte jeune	Adulte âgé
Streptocoque groupe B *Escherichia coli* *L. monocytogenes*	*S. pneumoniae* *N. meningitidis*	*N. meningitidis* *S. pneumoniae*	*S. pneumoniae* *L. monocytogenes* *N. meningitidis*

Prélèvement de LCR

Le prélèvement de LCR se fait habituellement par ponction lombaire (PL) dans l'espace L4–L5 ou L5–S1. Exceptionnellement, chez le nouveau-né, le prélèvement peut se faire par ponction transfontanellaire ou par ponction ventriculaire directe.

L'indication d'une PL est posée dans différents contextes :

- syndrome méningé ;
- en cas d'infection maternofœtale, pour éliminer toute atteinte méningée secondaire ;
- une PL de contrôle est parfois recommandé 36 à 48 heures après le début de l'antibiothérapie, pour vérifier l'efficacité du traitement antibiotique, un retard de stérilisation du LCR étant associé à la survenue de séquelles neurologiques. C'est le cas notamment des méningites à pneumocoques de sensibilité diminuée aux β-lactamines, et des méningites néonatales.

Autres prélèvements

En cas de suspicion de méningite bactérienne, on doit pratiquer, en plus du prélèvement de LCR, systématiquement des hémocultures. Enfin, les prélèvements réalisés au niveau de lésions purpuriques avec culture et recherche génomique sont recommandés. De plus, un prélèvement de sérum peut être utile pour les recherches génomiques en parallèle de celles pratiquées sur LCR.

De même, d'autres prélèvements peuvent être utiles : prélèvements périphériques voire maternels pour les nouveau-nés ou au niveau de portes d'entrée éventuelles.

Démarche diagnostique

En l'absence de contre-indication (hypertension intracrânienne, thrombopénie < 50 000/mm³), le LCR est recueilli par PL (respect des règles d'asepsie chirurgicale) dans trois tubes à hémolyse stériles devant contenir chacun 0,5 ml pour les examens de routine. Le LCR fait l'objet d'analyses biochimiques, cytologiques et bactériologiques (Fig. 14.1).

Du fait de l'importance du diagnostic, de la fragilité des bactéries à tout écart de température, et en raison de la lyse rapide des polynucléaires, le LCR, aussitôt prélevé, devra être acheminé au laboratoire pour analyses, à l'abri du froid.

Examen macroscopique

La première étape de l'analyse consiste à noter l'aspect du liquide. Le LCR normal est limpide et classiquement dit « eau de roche ». Différents aspects pathologiques peuvent être observés : eau de riz (ou trouble ; à partir d'environ 200 éléments/mm³), xanthochromique, hématique voire hémorragique. En cas de PL hémorragique, l'aspect xanthochromique du LCR après centrifugation peut témoigner d'une hémorragie méningée ancienne.

Analyse biochimique

Deux paramètres sont systématiquement dosés dans le LCR : la glycorachie et la protéinorachie.

La glycorachie doit toujours être déterminée simultanément à la glycémie, une glycorachie normale étant égale aux deux tiers de la glycémie. Une hypoglycorachie est généralement associée à une méningite bactérienne. Cependant, une hypoglycorachie est parfois observée lors de méningites ourliennes, de méningites à Entérovirus, de chorioméningites lymphocytaires, de méningo-encéphalites herpétiques ou à cytomégalovirus (CMV), de certaines méningites carcinomateuses, lors d'hémorragies méningées ou au cours des sarcoïdoses. La glycorachie est le premier paramètre à se normaliser dans la PL de contrôle, la persistance d'une hypoglycorachie étant de mauvais pronostic, et pouvant témoigner d'une ventriculite.

Les valeurs normales de la protéinorachie sont comprises entre 0,10 et 0,45 g/l, ces valeurs étant cependant plus élevées en période néonatale jusqu'à 2 mois (Tableau 14.2). Lors de méningites purulentes, la protéinorachie varie entre 1 et 5 g/l, et l'hyperprotéinorachie peut persister 2 à 3 semaines après le début de la méningite. Au cours du traitement, la protéinorachie est plus longue à se normaliser que la glycorachie ou la réaction cellulaire.

Des hyperprotéinorachies sont également observées dans certaines pathologies neurologiques, mais le contexte clinique diffère de celui des méningites.

Par ailleurs, en cas de suspicion de méningite tuberculeuse (BK), le dosage des chlorures montre une hypochlorurachie (normale : 110–120 meq/l).

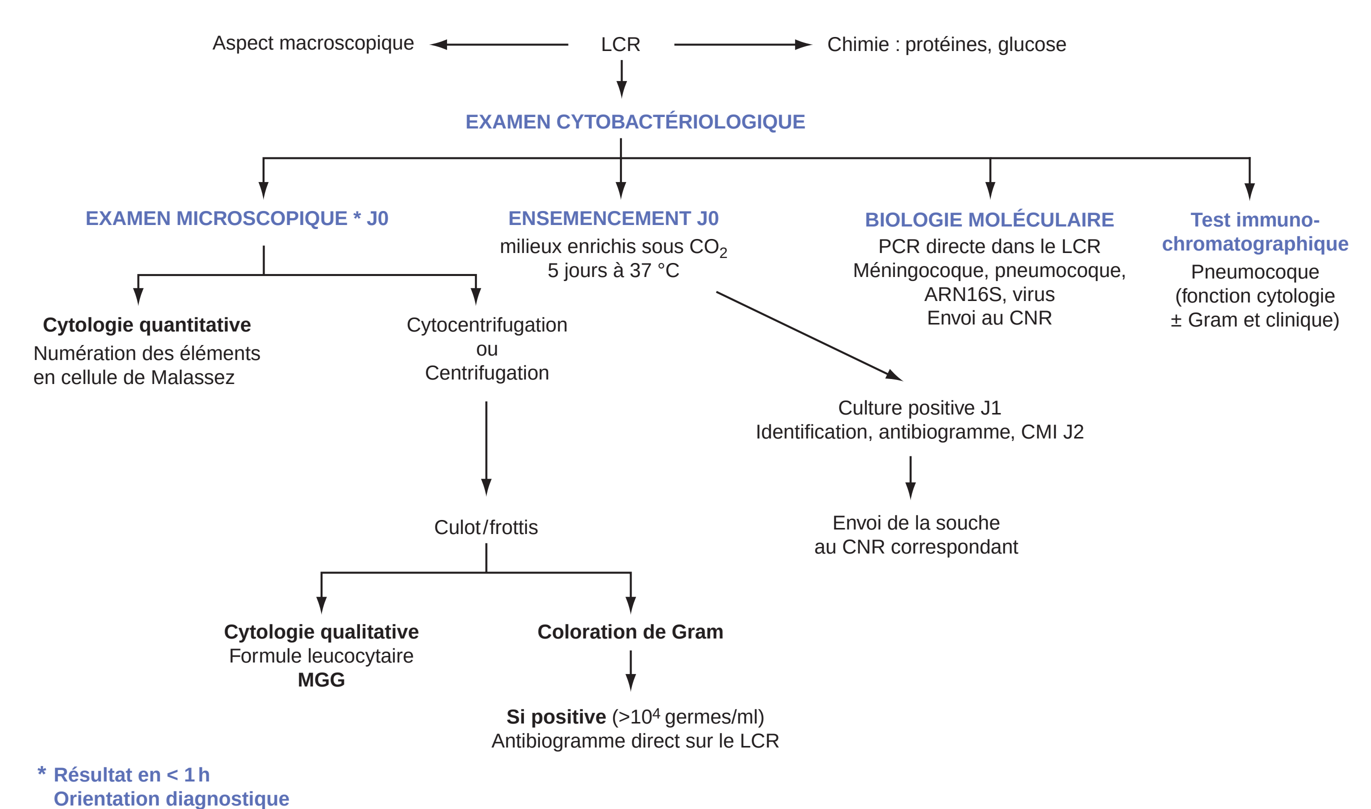


Fig. 14.1 **Démarche diagnostique sur le liquide céphalorachidien.**

Tableau 14.2 **Caractéristiques du LCR normal en fonction de l'âge.**

Âge	Aspect	Cellules par mm^3		Protéines (g/l)
		Moyenne	Écart	
Prématuré	Jaune ou rosé	9	0–29	0,65–1,50
Nouveau-né à terme ; 1re semaine de vie	Incolore ou xanthochromique	8	0–22	0,2–1,70
0–4 semaines	Incolore et limpide	11	0–50	0,35–1,89
4–8 semaines	Incolore et limpide	7	0–50	0,19–1,21
>6 semaines	Incolore et limpide	2	–	0,20–0,45

Tableau 14.3 **Orientation cytologique et biochimique des LCR.**

LCR	Aspect	Examen microscopique			Culture	PT (g/l)	Glu (mmol/l)	CRP
		Cytologie/ mm^3	Formule leucocytaire	Gram				PCT
Normal	Eau de roche	<5 <30 (NN)*	–	O		0,15–0,45	Deux tiers de la glycémie	Normal
Méningite purulente	Trouble Louche Eau de riz	>200*	Polynucléaires 80–90 %**	 Cg + Cg + Cg – Bg –	Bactéries Pneumocoque Streptocoque B Méningocoque *Haemophilus*, etc.	>1	< Deux tiers de glycémie	CRP +++ PCT +++
Méningite à liquide clair	Clair ou louche	100–500	Panaché	Bg +	*Listeria*	>1	< Deux tiers de glycémie	CRP ++ PCT ++
Méningite à liquide clair	Clair ou louche	100–500	Lymphocytes	Ziehl BAAR	*M. tuberculosis*	>1	< Deux tiers de glycémie	
Méningite à liquide clair	Clair ou louche	10–100	Lymphocytes	0	Virus* Cryptocoque	<1	Normale	CRP ± PCT –

* Penser aux méningites à entérovirus.
CRP : protéine C réactive ; NN : nouveau-né ; PCT : procalcitonine plasmatique ; PT : protéinorachie.
Cg : Cocci Gram ; Bg : Bacilles Gram

Enfin, en cas de suspicion de méningite virale (en particulier à virus Echo, Coxsackie, oreillons, CMV, VZV ou virus varicelle-zona) de même qu'en cas d'encéphalite herpétique, il y a augmentation de l'interféron α du LCR au début des signes cliniques (normale < 2 UI). Ce dosage est principalement réalisé par méthode biologique (culture cellulaire). Le dosage de l'interféron α doit être interprété en fonction du titre sérique, une atteinte virale méningée montrant une concentration plus élevée dans le LCR que dans le sérum.

Examen microscopique

La **numération en cellule de Malassez** permet d'évaluer le nombre d'éléments nucléés et d'hématies par mm^3. En dehors de la période néonatale, le LCR a une cellularité comprise entre 3 et 5 éléments/mm^3 (Tableau 14.2). En fonction de l'âge et au-delà de 10 éléments/mm^3, la formule leucocytaire est établie après cytocentrifugation et **coloration au May-Grünwald-Giemsa**. Elle n'est interprétable qu'à partir de 10 éléments/mm^3.

En cas de PL hémorragique non coagulée, une dilution dans du sérum physiologique permet de calculer le rapport hématies/leucocytes ; s'il est > 1000, il reflète le rapport sanguin, alors que s'il est < 1000, il peut témoigner d'un processus infectieux in situ.

La confrontation des données cytologiques et biochimiques du LCR oriente sur différentes hypothèses diagnostiques (Tableau 14.3).

- **LCR avec prédominance de polynucléaires**
  - Éléments > 10/mm^3, avec polynucléaires > 50 %
  - Hypoglycorachie
  - Hyperprotéinorachie

  } Probable méningite bactérienne

Généralement, le LCR des méningites bactériennes non traitées montre plus de 1000 éléments/mm^3 dont plus de 80 % de polynucléaires neutrophiles.

- **LCR avec prédominance lymphocytaire**
  - Éléments > 10/mm^3, avec lymphocytes > 50 %
  - Hyperprotéinorachie
  - Si hypoglycorachie : en faveur d'une méningite bactérienne ; principalement *Listeria monocytogenes* ou méningite tuberculeuse si hypochlorurachie

- Si normoglycorachie : en faveur d'une méningite virale, confirmée par dosage de l'interféron α et/ou éventuellement par amplification génique virale
- **LCR panaché**
  - Éléments > 10/mm³ ; environ 50 % de polynucléaires et de lymphocytes
  - Protéinorachie et glycorachie normales

Les hypothèses diagnostiques sont variables : listériose, méningite purulente ou lymphocytaire à son début, abcès cérébral.

En cas de méningite virale, notamment à entérovirus de type Echovirus, le nombre d'éléments peut être supérieur à 1000 éléments/mm³ ; initialement, on peut observer une majorité de polynucléaires comme dans les méningites bactériennes, avec évolution rapide vers une cellularité majoritairement lymphocytaire.

La **coloration de Gram,** élément essentiel du diagnostic, permet la mise en évidence des bactéries dans le LCR (Fig. 14.2 à 14.6). Elle se fait préférentiellement après cyto-

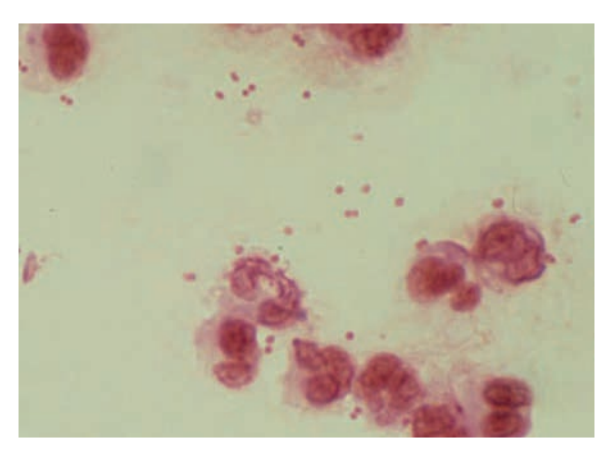


Fig. 14.4 Examen direct par coloration de Gram d'une méningite à *N. meningitidis*.

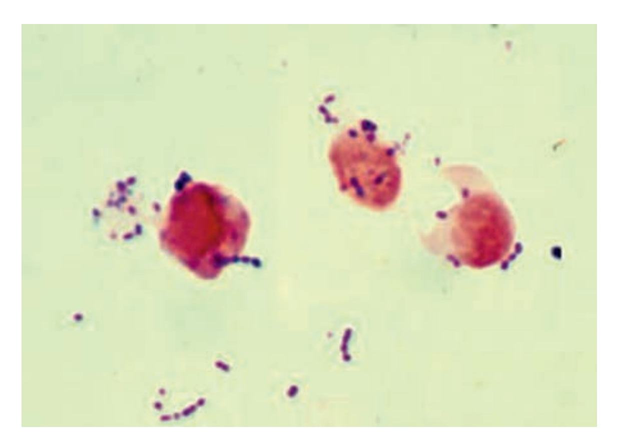


Fig. 14.2 Examen direct par coloration de Gram d'une méningite à *S. agalactiae*.

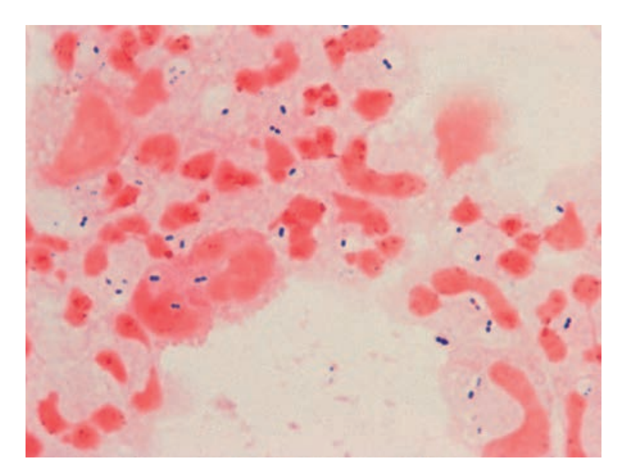


Fig. 14.5 Examen direct par coloration de Gram d'une méningite à *S. pneumoniae*.

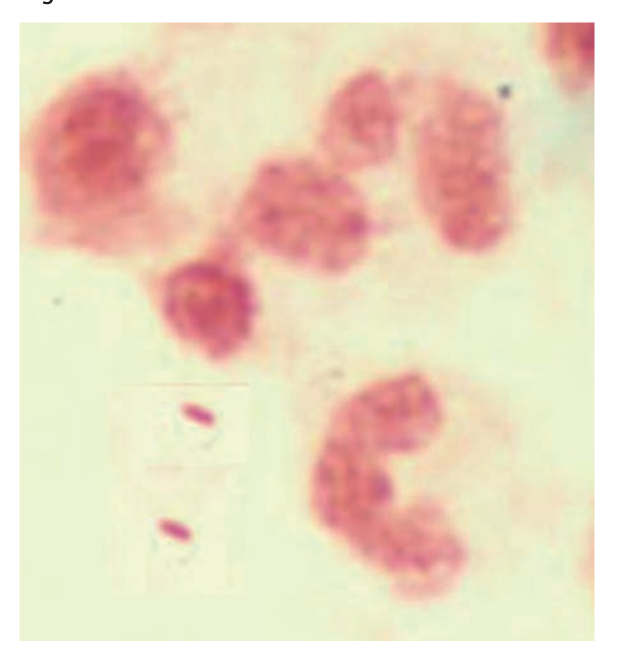


Fig. 14.3 Examen direct par coloration de Gram d'une méningite à *E. coli* K1.

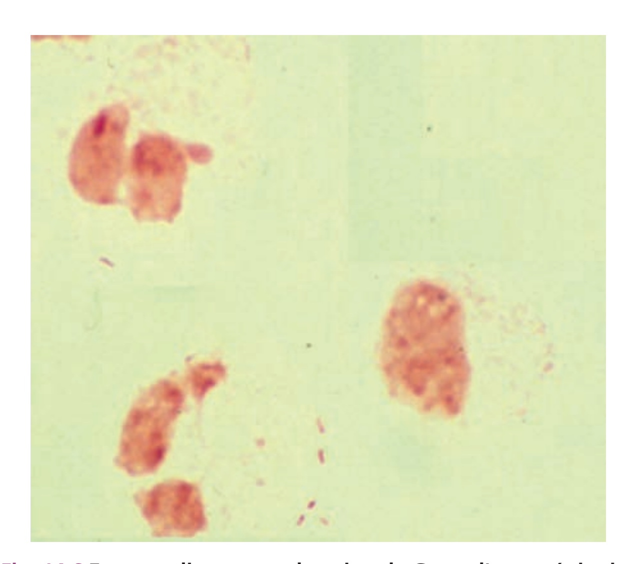


Fig. 14.6 Examen direct par coloration de Gram d'une méningite à *H. influenzae*.

centrifugation. La coloration de Gram est positive à partir d'une concentration bactérienne de 10^4 UFC/ml. Cet examen permet une estimation de la densité microbienne.

D'autres colorations peuvent être nécessaires :

- coloration de Zhiel-Neelsen pour *M. tuberculosis* ;
- encre de Chine : mise en évidence des levures encapsulées (*C. neoformans*).

Analyse bactériologique

L'ensemencement du LCR doit se faire dans un poste de sécurité microbiologique de type II sur des milieux de culture permettant la croissance des bactéries exigeantes.

Quel que soit le nombre d'éléments, le LCR est ensemencé sur milieux de culture adaptés aux bactéries recherchées. En effet, au tout début d'une méningite bactérienne, il est possible de constater une cellularité normale. Dans de rares cas et selon les données cliniques, la recherche de germes anaérobies peut être envisagée. Les cultures sont observées quotidiennement, avec une réponse provisoire à 48 heures, et conservées en incubation 5 jours. Selon la cytologie ou le contexte clinique, différentes possibilités peuvent être envisagées.

Les résultats possibles

Cytologie normale

Le LCR est ensemencé en quadrant sur gélose chocolat Isovitalex®, incubée 5 jours à 35 °C ± 2 °C sous 5 % à 10 % de CO_2 et sur gélose Columbia au sang incubée en anaérobiose.

Cytologie anormale et absence de germe à l'examen direct

La mise en culture du LCR sur gélose chocolat Isovitalex® sous 5 à 10 % de CO_2 et sur gélose Columbia au sang incubée en anaérobiose est complétée par l'ensemencement d'un bouillon cœur-cervelle. Ces deux milieux sont incubés 5 jours à 35 °C ± 2 °C.

Présence de germes à l'examen direct

La morphologie, le groupement et la coloration de Gram permettent d'orienter le diagnostic. *Neisseria*, streptocoque, bacilles peuvent avoir une morphologie typique, mais forme et Gram peuvent être atypiques ou modifiés par un traitement antibiotique. L'examen direct du LCR par la coloration de Gram est généralement positif à partir 10^4 à 10^5 UFC/ml. Les patients ayant une quantité initiale de germes ≥ 10^7 UFC/ml ont un risque de stérilisation retardée du LCR et de séquelles à court ou moyen terme plus élevés que chez les patients ayant un taux initial < 10^7 UFC/ml.

En conséquence, en plus de l'ensemencement classique, une culture quantitative doit être réalisée par ensemencement au râteau de 100 µl de LCR pur, et de dilutions du LCR au 1/10e et 1/100e en sérum physiologique, sur géloses chocolat Isovitalex® incubées à 35 °C ± 2 °C sous 5 à 10 % CO_2 (Fig. 14.7). Les densités microbiennes vont de $2{,}10^1$ à $4{,}10^9$ UFC/ml et sont plus élevées pour les méningites à pneumocoque ou *Haemophilus* qu'à méningocoque.

En cas d'examen direct positif, antibiogramme et détermination des CMI peuvent être directement tentés à partir du LCR, et sont confirmés secondairement après isolement bactérien (voir paragraphe « Identification bactérienne… »).

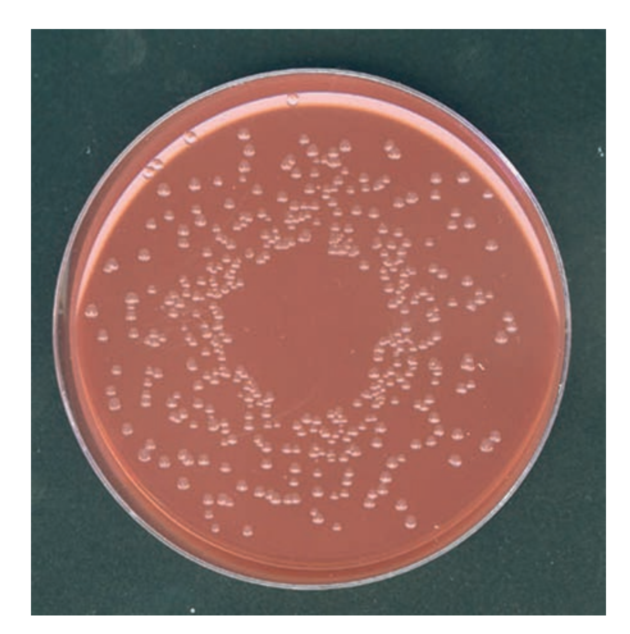


Fig. 14.7 Numération de germes dans le LCR après ensemencement au râteau ou au Spiralmeter. (Méningite à *E. coli* K1 – 10^5 UFC/ml.)

Cas particuliers

- Patients immunodéprimés : en cas de suspicion de cryptococcose méningée, on recherche le cryptocoque par examen direct à l'encre de Chine. De plus, les ensemencements de la gélose chocolat Isovitalex® et du bouillon cœur-cervelle sont complétés par la mise en culture du LCR sur gélose Sabouraud. Le plus souvent, dans les cryptococcoses méningées, le LCR est lymphocytaire et normoglycorachique.
- L'isolement de *S. aureus* et surtout non *aureus* à partir de LCR dans un contexte neurochirurgical, s'il n'est pas obtenu sur des ponctions successives, peut prêter à discussion (agent étiologique ou souillure, etc.).
- Suspicion clinique de tuberculose avec localisation méningée : l'ensemencement sur milieux traditionnels est complété par la mise en culture sur géloses Löwenstein et Coletsos.
- Selon les données cliniques, une recherche de leptospire peut être entreprise. Dans ce contexte, le LCR est normoglycorachique et montre une hypercellularité lymphocytaire.

Mise en évidence d'antigènes solubles

La recherche d'antigènes solubles de *N. meningitidis*, d'*Escherichia coli* sérotype K1 (avec communauté antigénique capsulaire K1 et *N. meningitidis* B), de streptocoque du groupe B et d'*H. influenzae* sérotype b n'est plus recommandée dans le LCR.

La technique immunochromatographique, reposant sur la mise en évidence du polysaccharide C de *S. pneumoniae* a une sensibilité supérieure a celle la technique d'agglutination et est recommandée dans le cas d'un suspicion de méningite bactérienne. Elle doit être réalisée sur le LCR lorsque la

Tableau 14.4 **Concentrations critiques des bêta-lactamines de *S. pneumoniae* et *N. meningitidis* selon le CA-SFM.**

	Concentrations critiques en mg/l			
	S. pneumoniae **(CA-SFM EUCAST 2014)**		***N. meningitidis*** **(CA-SFM EUCAST 2013)**	
	S	**R**	**S**	**R**
Pénicilline G	≤0,06	>0,06	≤0,06	>0,25
Amoxicilline	≤0,5	>0,5	≤0,12	>1
Céphalosporine 3e génération	≤0,5	>2	≤0,12	

cytologie est anormale sans germe à l'examen direct (si âge ≥ 1 mois) ou en cas de présence de cocci à Gram positif à l'examen direct.

Biologie moléculaire

La recherche de gènes spécifiques de certaines bactéries (*N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, etc.) ou de virus peut être réalisée à l'aide de techniques d'amplification génique (PCR) directement réalisées sur le LCR et sur sérum. Ces techniques spécifiques et rapides sont utiles lorsque l'examen direct est négatif ou en cas de méningite décapitée par les antibiotiques.

Ainsi, la détection de *N. meningitidis* avec précision du sérogroupe et du type clonal peut être effectuée, par PCR (Dr Taha, Centre national de référence [CNR] des *Neisseria*, Institut Pasteur, Paris). Cette technique permet d'orienter la prophylaxie des sujets contacts, en cas de culture négative. Elle peut également être réalisée sur une biopsie d'un élément purpurique dans le cas d'un purpura fulminans.

D'autres bactéries peuvent être recherchées par des PCR spécifiques en fonction du contexte clinique : tuberculose, borréliose, *Mycoplasma*, etc.

Identification bactérienne et détermination de la sensibilité aux antibiotiques

Les bactéries isolées font l'objet d'une identification allant jusqu'au sérogroupe ou sérotype pour *N. meningitidis*, *L. monocytogenes*, *S. pneumoniae* et *H. influenzae*, au sein soit du laboratoire d'analyse, soit du CNR spécifique auquel la souche doit être adressée. En cas de méningite méningococcique, la prophylaxie vaccinale des sujets contacts dépend du sérogroupe de la souche.

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques repose sur l'antibiogramme standard selon les recommandations du CA-SFM, voire sur la détermination des CMI par E-test® pour *S. pneumoniae* et *N. meningitidis*.

En 2013, 24 % des souches de pneumocoques isolées d'infections invasives étaient de sensibilité diminuée à la pénicilline G (22 % pénicilline et 4 % céfotaxime). La tendance à la diminution de la résistance à la pénicilline G quel que soit le groupe d'âge des patients amorcée entre 2001 et 2008 se confirme. En 2013, on observe une diminution des infections à sérotype vaccinal (PCV7 et sérotypes additionnels du PCV13) avec une augmentation des infections à sérotypes non vaccinaux (10A, 24F et 15A/B/C chez l'enfant) (données du CNR Pneumocoque, Rapport 2014).

En 2013, 24 % des souches de *N. meningitidis* isolées de méningites étaient de sensibilité diminuée à la pénicilline G avec des CMI maximales à 0,75 mg/l (données du CNR Méningocoque, Rapport 2013).

Pour les méningites à *S. pneumoniae* et à *N. meningitidis*, les CMI de la pénicilline G, de l'amoxicilline et du céfotaxime ou de la ceftriaxone sont donc primordiales à déterminer pour adapter le traitement antibiotique. Les recommandations du CA-SFM- figurent dans le tableau 14.4.

Autres examens biologiques

Parallèlement à l'étude du LCR, le diagnostic et le bilan biologique d'une méningite sont complétés par d'autres examens biologiques comme il a été dit. Les hémocultures doivent être systématiquement pratiquées, une au minimum, pour majorer les chances d'isolement du germe.

Dans le cadre du bilan biochimique, les dosages et les évolutions de la protéine C réactive (CRP) et/ou de la procalcitonine plasmatique (PCT) sont également essentiels pour le diagnostic et le suivi du traitement des méningites bactériennes. La PCT est plus sensible et spécifique que la CRP, lors d'un processus infectieux bactérien. Lors d'une méningite bactérienne, l'élévation de la PCT est plus importante et plus précoce que celle de la CRP. Ainsi, le dosage de la PCT permet de différencier précocement méningite bactérienne et méningite virale et diminue rapidement sous traitement antibiotique adapté.

Enfin, ce bilan biologique est complété par une numération, formule sanguine. Une leucopénie est considérée comme un critère de gravité.

Déclaration à l'Agence régionale de santé (ARS) et envoi des souches au CNR

Les méningites à méningocoque et à *Listeria* font partie des maladies à déclaration obligatoire. Elles doivent être signalées sans délai à l'ARS par le médecin ayant en charge le patient, pour permettre une prise en charge rapide des sujets contacts (antibioprophylaxie) en cas de méningocoque (famille, collectivité), ou afin de rechercher un aliment source de la contamination en cas de *Listeria*. Dans les cas du méningocoque, le sérogroupe doit être identifié rapidement pour permettre une prophylaxie adaptée des cas contacts (vaccination).

L'envoi des souches au CNR correspondant est recommandé afin de permettre la mise à jour épidémiologique des souches circulant sur le territoire, mais aussi pour le typage, le sous-typage, la caractérisation des clones et la résistance aux antibiotiques des bactéries responsables de méningites bactériennes si cela n'est pas réalisé en routine. Il est important de fournir au CNR des informations sur les vaccinations reçues par le patient (pneumocoque, méningocoque, *Haemophilus*).

Pour en savoir plus

Bingen E. Méningites bactériennes communautaires. Paris : Elsevier ; 2001.

Brouwer MC, Thwaites GE, Tunkel AR, et al. Dilemmas in the diagnosis of acute community-acquired bacterial meningitis. Lancet 2012 ; 380 : 1684–92.

Centre national de référence des méningocoques, Rapport d'activité année ; 2013a.

Centre national de référence des pneumocoques, Rapport d'activité année ; 2013b.

Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie ; 2013 et 2014.

Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse, Les méningites purulentes communautaires ; SPILF 2008. Med Mal Inf 2009 ; 39(3) : 145–210.

Gendrel D, Bohuon C. Procalcitonin in pediatrics for differentiation of bacterial and viral infections. Intensive Care Med 2000 ; 26 : S178–81.

Instruction n° DGS/RI1/DUS/2014/301 du 24 octobre 2014 relative à la prophylaxie des infections invasives à meningocoques.

Levy C, Varon E, Taha MK, et al. Évolution des méningites bactériennes de l'enfant en France sous l'effet des vaccinations. Archives de Pédiatrie 2014 ; 21(7) : 736–44.

Marcos M, Martinez E, Almela M, et al. New rapid antigen test for diagnosis of pneumococcal meningitis. 2, Lancet 2001 ; 357(9267) : 1499–500.

Réseau EPIBAC, Infections invasives d'origine bactérienne, http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-prevention-vaccinale/Infections-invasives-d-origine-bacterienne-Reseau-EPIBAC/Bulletin-du-reseau-de-surveillance-des-infections-invasives-bacteriennes.

Adresses utiles pour les méningites bactériennes

Centre national de référence des méningocoques
Dr Mohamed Taha
Institut Pasteur
Unité des *Neisseria*
25/28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15
Tél. : 01 45 68 83.30 ou 01 40 61 31 08 – Fax : 01 40 61 30 34
E-mail : meningo@pasteur.fr

Centre national de référence des pneumocoques
Dr Emmanuelle Varon
Hôpital européen Georges Pompidou
Laboratoire de microbiologie
20, rue Leblanc, 75908 Paris cedex 15
Tél. : 01 56 09 39 67 – Fax : 01 56 09 24 46
E-mail : emmanuelle.varon@aphp.fr

Centre national de référence des *Haemophilus influenzae*
Dr Olivier Gaillot
Pôle de biologie pathologie génétique du CHU de Lille
Boulevard du Professeur J. Leclercq
59037 Lille cedex
Tél. : 03 20 44 54 80 – Fax : 03 20 44 48 95
E-mail : olivier.gaillot@chru-lille.fr

Centre national de référence des streptocoques
Pr Claire Poyart
Groupe hospitalier Cochin-Saint-Vincent-de-Paul, service de bacteriologie
27, rue du Faubourg Saint-Jacques
75679 Paris cedex 14
Tél. : 01 58 41 15 44 – Fax : 01 58 41 15 48
E-mail : claire.poyart@aphp.fr

Centre national de référence associé des *Escherichia coli*
Pr Édouard Bonacorsi
Hôpital Robert Debré, service de microbiologie
48, boulevard Serrurier, 75019 Paris
Tél. : 01 40 03 23 40 – Fax : 01 40 03 24 50
E-mail : stephane.bonacorsi@aphp.fr

Diagnostic bactériologique des infections gastro-intestinales

P. Mariani-Kurkdjian, S. Bonacorsi, E. Bingen

PLAN DU CHAPITRE

Introduction

Les diarrhées aiguës infectieuses sont responsables, dans les pays en voie de développement, du tiers des décès par déshydratation. Elles restent fréquentes dans nos régions, comme en témoigne la fréquence des toxi-infections alimentaires familiales ou des collectivités (crèches, etc.).

La diarrhée aiguë est définie par l'émission d'au moins trois selles liquides et/ou molles par jour depuis moins de 14 jours. Tous les épisodes diarrhéiques (selles fécales) ou dysentériques (selles aqueuses, non fécales) ne sont pas infectieux. Toutes les diarrhées infectieuses ne sont pas bactériennes : virus, parasites, et accessoirement levures, y jouent un rôle important. Toutes les diarrhées bactériennes ne sont pas dues à des bactéries spécifiques (diarrhées par dysmicrobisme, c'est-à-dire par modification dans l'équilibre des flores intestinales).

Les gastro-entérites aiguës sont l'un des premiers motifs de consultation en médecine générale et en pédiatrie. La déshydratation est leur principale complication chez l'enfant et demande une prise en charge symptomatique sans délai (réhydratation avec des solutions de réhydratation orale), avant ou en même temps que toute investigation microbiologique si celle-ci est faite. Cette conduite est d'autant plus urgente que l'enfant est petit, la déshydratation constituant un signe d'alerte à partir de 5 % de perte de poids corporel, pouvant mettre en jeu le pronostic vital au-delà de 10 %.

La plupart des gastro-entérites sont d'origine virale. Les rotavirus sont responsables de plus de 50 % des cas, surtout chez le nourrisson. Les norovirus surviennent à tout âge et sont souvent liés à une contamination alimentaire (eau, crudités, coquillages), source d'épidémies dans les collectivités (écoles, casernes, hôtels, croisières). Ils sont les principaux agents devant les adénovirus 40 et 41, les astrovirus et les coronavirus. Leur diagnostic est rarement nécessaire dans les gastro-entérites communautaires hivernales, hormis les formes sévères chez le nourrisson hospitalisé (essentiellement rotavirus), les diarrhées chez l'immunodéprimé, les cas groupés et les infections nosocomiales.

En bactériologie, la prescription d'une coproculture doit être envisagée après avoir éliminé une cause non infectieuse de diarrhée grâce à l'examen clinique et l'interrogatoire. Cette prescription est justifiée en cas de diarrhée aiguë survenant dans un contexte anamnestique et clinique évocateur d'une origine bactérienne (fièvre > 40 °C, présence de glaires et/ou sang dans les selles, douleur abdominale, retour de zone endémique, par exemple) ou dans certains contextes particuliers : toxi-infection alimentaire collective (TIAC), patient immunodéprimé, par exemple. Elle s'avère inutile en cas de diarrhée chronique, à l'exception du patient immunodéprimé. Seuls des renseignements cliniques pertinents communiqués au microbiologiste par le clinicien permettent d'orienter la recherche vers des agents pathogènes particuliers. Actuellement, trop de demandes d'analyses pour diarrhées supposées bactériennes ne comportent pas les données cliniques nécessaires et font de la coproculture l'un des examens les moins efficients de la bactériologie.

En cas de persistance des signes cliniques ou dans un contexte de voyage, il est nécessaire de s'orienter vers le diagnostic d'une parasitose.

Étiologie bactérienne des gastro-entérites aiguës

Il existe plus d'une dizaine d'agents bactériens responsables de diarrhées, nécessitant parfois une technique spécifique pour leur recherche.

De nombreuses bactéries sont incriminées dans l'étiologie des diarrhées infectieuses aiguës. Certaines d'entre elles ont un pouvoir entéropathogène bien établi (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp., etc.) (Tableau 15.1). D'autres bactéries sont devenues pathogènes après acquisition de facteurs de virulence. C'est le cas en particulier d'*Escherichia coli*, espèce représentant 80 % de la flore intestinale aérobie de l'homme. *E. coli* est à la fois une bactérie commensale et une bactérie entéropathogène par l'expression de facteurs de virulence acquis et/ou constitutifs. Ainsi, un pouvoir entéropathogène est actuellement reconnu pour six pathovars d'*E. coli*.

Les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC) sont responsables de diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement et de la diarrhée du voyageur. Les *E. coli* entéro-invasifs (EIEC) sont responsables de dysenteries proches de la shigellose. Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont retrouvés au cours des colites hémorragiques et du syndrome hémolytique et urémique (SHU) typique. Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont la cause de diarrhées infantiles persistantes souvent épidémiques dans les pays en voie de développement. Certains sérotypes d'EPEC ont également été incriminés au cours du SHU.

Les *E. coli* à adhésion diffuse (*diffusely-adhering E. coli* [DAEC]) et les *E. coli* entéroaggrégatifs (EAggEC) sont à l'origine de diarrhées aqueuses persistantes chez l'enfant.

Objectifs de l'examen microbiologique des gastro-entérites

Le but essentiel de la coproculture est de rechercher parmi une flore commensale très abondante des bactéries habituellement absentes et réputées pour leur pouvoir pathogène. La stratégie repose actuellement sur la réalisation d'une coproculture standard a minima avec la recherche des agents les plus fréquents et en dehors d'un contexte clinique.

- **Adulte ou enfant de plus de 2 ans et contexte par défaut :** réalisation d'une coproculture standard comprenant la recherche de *Salmonella* spp., de *Shigella* spp. et de *Campylobacter* spp. (voire *Yersinia* spp. sur prescription spécifique).
- **Enfant de moins de 2 ans :** réalisation d'une coproculture standard en sachant que l'étiologie virale prédomine dans cette tranche d'âge.
- **Contextes cliniques particuliers**
  - Voyage récent en « pays tropical » : en présence d'un syndrome cholériforme, il faut rechercher *Vibrio cholerae*. D'autres bactéries peuvent être responsables de syndromes cholériformes comme les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC) ou plus rarement *Plesiomonas shigelloides*. En plus des bactéries recherchées au cours de la coproculture standard, il faut également suspecter d'autres pathogènes : *Vibrio parahaemolyticus*, *Aeromonas* spp., *E. coli* entéro-invasifs (EIEC).
  - Diarrhées par dysmicrobisme secondaire à une antibiothérapie : la majorité des diarrhées postantibiotiques sont bénignes et liées à une modification de la flore colique qui ne métabolise plus suffisamment les hydrates de carbone dans le côlon. Ceux-ci entraînent une augmentation de la pression osmotique et un afflux excessif d'eau intraluminale responsable de diarrhée. Cette diarrhée bénigne est à distinguer de la diarrhée à *Clostridium difficile* toxinogène dont les formes majeures sont la colite pseudomembraneuse et la colite fulminante. La diarrhée à *C. difficile* peut survenir pendant l'antibiothérapie ou plusieurs semaines après son arrêt. Les principaux antibiotiques en cause sont les bêta-lactamines, la clindamycine et plus récemment les fluoroquinolones, mais la quasi-totalité des antibiotiques peut être impliquée. *Klebsiella oxytoca* productrice de cytotoxine est maintenant reconnue comme cause de colite hémorragique postantibiotique.
  - Diarrhées sanglantes : en dehors de *Shigella* spp. provoquant des diarrhées fréquemment sanglantes, les *E. coli* producteurs de shigatoxine (STEC) dénommés *Escherichia* entérohémorragiques chez l'homme (EHEC) doivent être systématiquement recherchés.
  - TIAC : une TIAC est définie par la survenue d'un syndrome gastro-intestinal (diarrhée et/ou vomissement) similaire chez au moins deux personnes ayant partagé un repas en commun. L'isolement d'un agent pathogène n'est donc pas indispensable pour définir une TIAC. Elle doit faire l'objet d'une déclaration obligatoire aux autorités de santé. On distingue habituellement :
    - les TIAC d'incubation courte (1 à 4 heures) non fébriles dues à la présence dans l'aliment ingéré de toxines préalablement sécrétées par *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. L'agent pathogène et/ou la toxine sont à rechercher dans l'aliment et non dans les selles ;

Tableau 15.1 **Mécanismes pathogéniques des bactéries entéropathogènes.**

Entéro-invasif	Cytotoxique	Toxigénique	Adhérent
Salmonella	*C. difficile*	*Vibrio cholerae*	EPEC
Shigella	*Shigella*	*Shigella*	EHEC
Y. enterocolitica	EPEC	*Y. enterocolitica*	EAggEC
Campylobacter EIEC	EHEC	ETEC	

- les TIAC d'incubation longue (12 à 76 heures) dues à *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp. Une TIAC avec diarrhée sanglante doit impérativement conduire à la recherche d'EHEC.

– Syndrome pseudo-appendiculaire : il faudra rechercher *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp.
– Cas groupés de gastro-entérites d'origine virale : survenant toute l'année, en collectivité et services de gériatrie sous forme de cas groupés ou d'épidémies localisées, les norovirus sont les premiers responsables, suivis des rotavirus.
– Gastro-entérites nosocomiales virales : le diagnostic est fait par immunodétection ou RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) qui permettent de détecter les principaux virus (rotavirus, adénovirus, par exemple) en cause et de renforcer les mesures d'hygiène, en particulier dans les services à risque (néonatologie, oncologie, par exemple).
– Les coprocultures « réglementaires » : dans certains cas particuliers, une coproculture peut être demandée à titre réglementaire. Ainsi, selon les recommandations du Haut conseil de santé publique, après une diarrhée à *Shigella* spp., à EHEC ou au décours d'une fièvre typhoïde ou paratyphoïde, la réintégration en collectivité nécessite l'obtention d'un certificat médical attestant de deux coprocultures négatives à 24 heures d'intervalle et 48 heures après l'arrêt des antibiotiques lorsque ceux-ci sont indiqués.
– Détection de colonisation par des bactéries multirésistantes (BMR).
– Détection de portage chez le personnel de restauration (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*).

Prélèvement et transport

La coproculture se pratique sur des selles liquides, molles, glaireuses ou hémorragiques, ou sur indications très précises pour des selles solides.

Le prélèvement est réalisé dans les premiers jours de la maladie et, si possible, avant le début de l'antibiothérapie. La prescription d'une seule coproculture est en général suffisante. Les selles sont recueillies dès leur émission. Une aliquote de la selle, du volume d'une noix, est prélevée à l'aide d'une spatule ou d'un flacon-cuillère puis transférée dans un conteneur hermétique transparent propre à usage unique. La partie mucopurulente ou sanglante doit être privilégiée, en cas de présence.

Un écouvillonnage rectal peut se révéler utile notamment chez le nourrisson et le petit enfant, et en particulier dans le cadre d'un SHU post-diarrhée.

Les biopsies de muqueuses rectale ou colique (si réalisées dans un contexte diarrhéique) sont analysées comme des matières fécales. Chez des patients non immunodéprimés, il n'y a pas de supériorité à rechercher les bactéries entéropathogènes à partir de biopsies par rapport au prélèvement standard.

Le prélèvement doit être acheminé rapidement au laboratoire avec la fiche de renseignements cliniques. En cas de prise en charge technique différée, les selles sont conservées à +4 °C et ensemencées dans les 12 heures au maximum. L'utilisation d'un milieu de conservation tel que le milieu Cary-Blair permet de retarder l'analyse jusqu'à 48 à 72 heures.

Pour les virus, le diagnostic nécessite un prélèvement de selles qui peut être conservé à +4 °C pendant 24 à 48 heures.

Démarche diagnostique

Examen macroscopique

L'aspect macroscopique des selles sera toujours noté et guidera le choix des milieux de cultures. On doit noter la consistance, la présence de glaires, de pus, de sang.

Examen microscopique

L'**examen direct à l'état frais** permet de déceler la présence de leucocytes et d'hématies dans les selles (éventuellement de parasites). Il est possible si les selles sont diarrhéiques ou afécales.

- En cas de diarrhée à germes invasifs : il y a présence de leucocytes (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp.).
- En cas de diarrhée à germes entérotoxigéniques : il n'y a pas de leucocytes (*V. cholerae*, *Aeromonas* spp., *C. difficile*).

Cependant, dans certaines diarrhées à bactéries invasives, la présence de leucocytes n'est pas toujours constante.

On note donc la présence de leucocytes, d'hématies, de cellules, la densité et la mobilité de la flore bactérienne (*Campylobacter*, *Vibrio*), la présence éventuelle de levures.

L'**examen du frottis après coloration de Gram**, bien que peu informatif, permet d'apprécier l'importance et l'équilibre de la flore entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Une flore équilibrée est composée majoritairement de bacilles à Gram négatif, mais avec toujours présence de bacilles à Gram positif. Toute perturbation notable de cet équilibre doit être signalée. La forme pathognomonique des *Campylobacter* spp. (Fig. 15.1) permet de poser le diagnostic dès l'examen direct des selles.

Le mode opératoire est le suivant :

- selle solide : dilution de la selle au 1/10e dans de l'eau distillée ; bien agiter au vortex ; faire un étalement de la suspension sur lame et colorer ;
- selle liquide : déposer directement une goutte de selle sur lame et colorer.

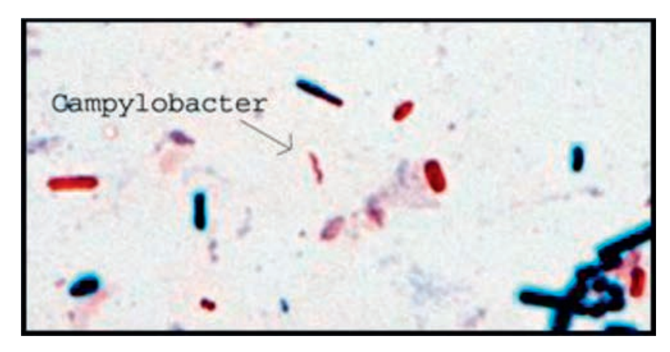


Fig. 15.1 ***Campylobacter*** **spp. à la coloration de Gram.**

Ensemencement

Milieux, inoculum, durée et température d'incubation

Des milieux sélectifs d'isolement et des milieux d'enrichissement sont utilisés en fonction du contexte clinique.

La recherche de salmonelles et shigelles doit être systématique et doit être effectuée sur un milieu sélectif de type Hektoen ou xylose lysine désoxycholate ou SS (*Salmonella-Shigella*). Ce dernier milieu, toutefois, ne permet pas l'isolement de *S. dysenteriae* de type 1. Il existe aussi des milieux chromogènes adaptés à la recherche de *Salmonella* spp. (SM ID2, OSCM II, etc.).

Ces milieux sont incubés à 35 °C ± 2 °C pendant 24 heures.

Pour la recherche de *Salmonella*, on ensemence un milieu d'enrichissement au sélénite (milieu de Leifson) ou au tétrathionate (milieu de Mueller-Kauffmann) avec 0,5 ml de selle. Le milieu d'enrichissement est repiqué après 14 à 16 heures d'incubation à 35 °C ± 2 °C afin d'éviter la multiplication des bactéries commensales mal inhibées au-delà de ce délai.

Il n'existe pas de milieu d'enrichissement pour les *Shigella*.

Le mode opératoire est le suivant :

- dilution de la selle au 1/10e dans de l'eau distillée ;
- ensemencer systématiquement :
  – une goutte de la dilution en quadrant sur un milieu pour recherche de salmonelle, shigelle (Hektoen, SS, milieux chromogènes) ;
  – une goutte de la dilution en bouillon Mueller-Kauffman (pour l'enrichissement en salmonelle).
- en fonction du contexte, ensemencer en plus :
  – un milieu de Karmali pour la recherche de *Campylobacter* pour les enfants de moins de 3 mois et/ou en cas de suspicion à l'examen direct (voir chapitre 31.1) ;
  – selles sanglantes :
    - un milieu MacConkey sorbitol pour la recherche d'*E. coli* O157 et autres EHEC et conserver la selle pour recherche de *Shiga-like* toxines (voir chapitre 30.2) ;
    - un milieu sélectif pour *Yersinia* (voir chapitre 30.2) ;
    - un milieu sélectif pour rechercher les *Clostridium difficile* toxinogènes (voir chapitre 37.3) ;
  – en cas de suspicion de choléra : l'investigation d'un cas de choléra est un examen urgent et spécialisé. La recherche de *V. cholerae* se fait par ensemencement direct sur milieu gélosé spécifique (thiosulfate-citrate-bile-saccharose [TCBS], par exemple) et parallèlement par enrichissement en eau peptonée alcaline à 1 % de NaCl repiquée après 6 heures d'incubation sur milieu gélosé spécifique (TCBS, par exemple ; voir chapitre 30.3).
  – les diarrhées aqueuses de retour de voyage sont le plus souvent liées aux ETEC. La recherche de ce pathotype n'est pas réalisée en pratique courante ;
  – en cas de TIAC, les bactéries les plus fréquemment en cause sont *Salmonella* spp., *C. perfringens*, *S. aureus* et *B. cereus*. Pour ces deux derniers pathogènes, le syndrome diarrhéique peut être lié à la production d'entérotoxine dans l'aliment en cause. Le diagnostic est du ressort de centres spécialisés certifiés pour l'analyse alimentaire. Plus rarement, une TIAC peut être causée par :
    - *Vibrio parahaemolyticus* (consommation de coquillages) qui peut être recherché par une étape d'enrichissement puis repiquage sur gélose sélective comme *V. cholerae* ;
    - *Plesiomonas shigelloides* (isolement sur une gélose de MacConkey, ou Hektoen) ;
    - *C. perfringens* (mise en évidence de *C. perfringens* ou de son entérotoxine dans les selles). *C. perfringens* peut être recherché également dans l'aliment en cause (préparation culinaire, surtout à base de viandes). Des milieux sélectifs tels que tryptose-sulfite-cyclosérine (TSC) peuvent être utilisés. La recherche de l'entérotoxine dans les selles peut être faite par des tests rapides (ELISA, agglutination particules de latex), en pratique rarement disponibles dans les laboratoires de biologie médicale ;
    - *B. cereus* : peut être recherché dans les aliments ou dans les selles où le seuil significatif est de 10^5 UFC/g. La toxine émétisante ou diarrhéique peut être recherchée à partir des colonies isolées.
- un milieu de Sabouraud : si présence de levures à l'examen direct.

La démarche diagnostique de la coproculture est résumée dans la figure 15.2.

Recherche de salmonelles

L'orientation s'effectue selon l'aspect de colonies :

- sur milieu Hektoen après 24 heures à 37 °C, les colonies suspectes sont H2S + et lactose – ;
- sur la gélose SS, la présence de colonies incolores ou faiblement colorées avec ou sans centre noir est une forte présomption de *Salmonella* ou de *Shigella* ;
- sur les milieux chromogènes, la détection spécifique de l'estérase des *Salmonella* donne une coloration des colonies variant du rose au mauve (Fig. 15.3). Sur ces milieux, les selles peuvent présenter une activité C8-estérase, et on peut observer une coloration rose du milieu en début d'isolement. De plus, les *Salmonella* Dublin, Abortusovis et Gallinarum ne donnent pas de colonies roses mais des colonies blanches ou à coloration faible. Il faut donc toujours comparer avec le milieu Hektoen (présence de colonies sucres négatives, H2S +).

On repère trois à cinq colonies suspectes : colonies rose à pourpre sur milieu chromogène et/ou colonies vertes à centre noir (lactose –, saccharose –, salicine –, H2S +, oxydase –) sur milieu Hektoen, et on les identifie en spectrométrie de masse.

Sur une colonie identifiée salmonelle, faire l'antibiogramme et la CMI de l'azithromycine et ensemencer un Kligler-Hajna pour effectuer l'identification sérologique par agglutination à l'aide des immunsérums.

En cas d'indisponibilité de la spectrométrie de masse, identifier 1 à 3 colonies suspectes sur milieu chromogène par API 20 E® + Kligler/Hajna, faire l'antibiogramme et déterminer la CMI à l'azithromycine.

L'identification définitive se fait par les caractères biochimiques et l'étude de la formule antigénique (voir le chapitre 30.2 consacré aux entérobactéries). Un test présomptif des

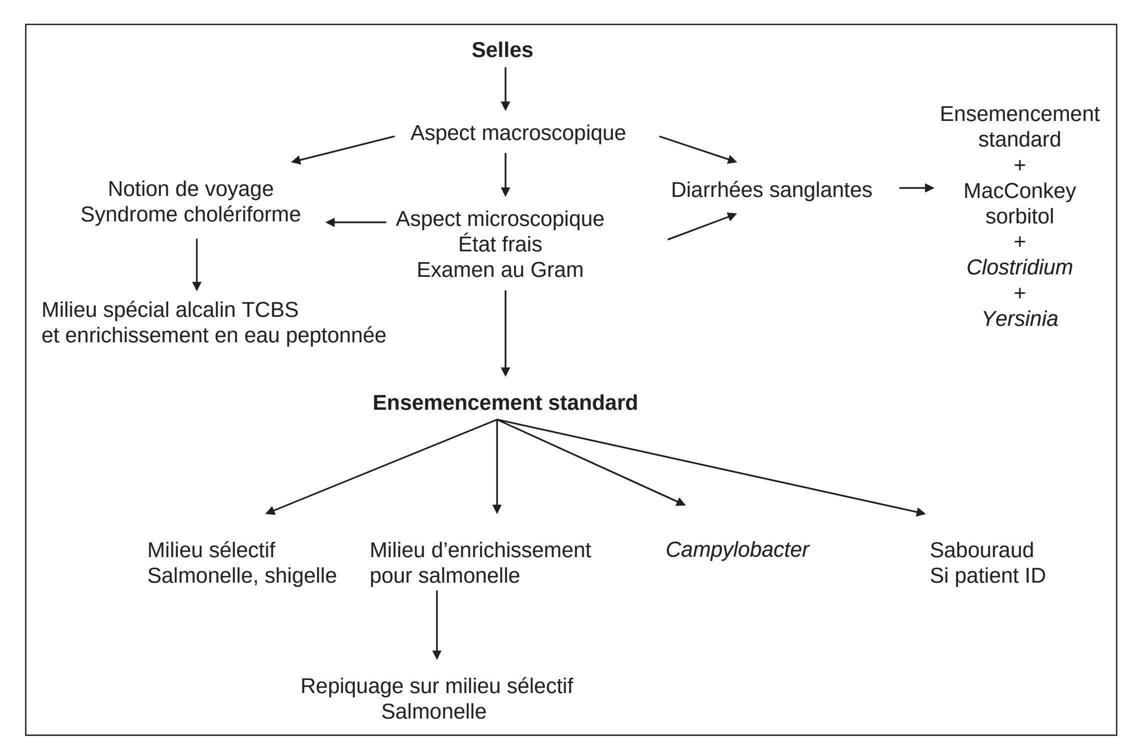


Fig. 15.2 Démarche diagnostique d'une coproculture.

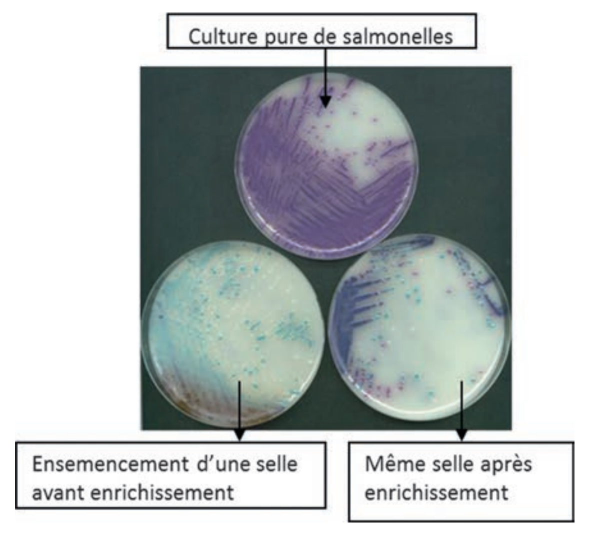


Fig. 15.3 Aspect des colonies de *Salmonella* sur milieu chromogène.

salmonelles consiste en la lyse par les bactériophages spécifiques (phage *Salmonella* 01 de Felix et Callow, Biorad) pratiquée sur une gélose Mueller-Hinton en déposant une microgoutte d'une suspension phagique. À partir de la 5e heure d'incubation à 37 °C, on peut déjà voir une plage de lyse au niveau du dépôt de la goutte.

Toutes les souches de salmonelles doivent être notifiées au Centre national de référence (CNR) des salmonelles. Les cas pour lesquels les souches devront être envoyées au CNR sont précisés dans le chapitre 30.2.

Recherche de shigelles

Génétiquement, les *Shigella* sont des *E. coli*, immobiles, auxotrophes, adaptés à l'homme et porteurs d'un plasmide d'invasivité. L'isolement et l'identification des *Shigella* spp. sont donc délicats.

Repérer les colonies suspectes sur milieu Hektoen : colonies vertes (lactose –, saccharose –, salicine –, H2S –) oxydase –.

L'identification par spectrométrie de masse ne permet pas de distinction fiable entre *Shigella* et *E. coli* mais permet de ne retenir que les colonies dont l'identification sera poursuivie. Il faut donc procéder à une identification biochimique par galerie API 20 E®, ensemencer un milieu Kligler/Hajna et faire un antibiogramme et une CMI de l'azithromycine sur une colonie identifiée *E. coli/Shigella*.

Diagnostic différentiel du genre *Shigella* (Tableau 15.2)

Shigella est à la fois immobile, non gazogène (sauf variété de *S. flexneri* G), H_2S, uréase, LDC, ONPG, citrate Simons, citrate de Christensen et acétate de Trabulsi négatifs.

Diagnostic d'espèce des *Shigella* (caractères discriminants)

Ce diagnostic est décrit au Tableau 15.3.

Identification antigénique des *Shigella*

- Utiliser une culture en milieu solide non inhibiteur. Faire les agglutinations de préférence à partir des colonies réensemencées sur milieu de Kligler-Hajna.
- Effectuer les agglutinations à l'aide d'immunsérums spécifiques.

Tableau 15.2 **Caractères différentiels entre *Shigella* et certaines souches d'*E. coli.***

Caractères	*Shigella*	*E. coli*	
		E. coli typique	*Alkalescens-dispar*
ONPG	d	+	+
Gaz en glucose	–	+	–
Mobilité	–	+	–
LDC	–	d	d
Acétate de Trabulsi	–	+	d
Citrate Christensen	–	+	d
Indole	d	+	+

– le plus souvent négatif ; + : le plus souvent positif ; d : variable d'une espèce à l'autre.

Tableau 15.3 **Caractères différentiels des différentes espèces de *Shigella.***

Caractères	*S. dysenteriae*	*S. flexneri*	*S. boydii*	*S. sonnei*
ONPG	d	–	–	+
Mannitol	–	+	+	+
Indole	–	d	d	–
ODC	–	–	–	+

– le plus souvent négatif ; + : le plus souvent positif ; d : variable d'une espèce à l'autre.

- Les sérotypes les plus répandus en France sont *S. sonnei* et *S. flexneri.*

Envoi de la souche au CNR *E. coli-Shigella*

Toutes les souches de shigelles sauf *S. sonnei* (dans ce cas, n'envoyer que la fiche de renseignement complétée pour information) seront envoyées.

La démarche diagnostique de la recherche des salmonelles et shigelles en cas d'indisponibilité de la spectrométrie de masse est résumée dans la figure 15.4.

Recherche de *Campylobacter* spp

Les *Campylobacter* spp. représentent désormais la deuxième cause de gastro-entérite bactérienne en France. Elle doit être systématiquement réalisée chez les enfants et pour les adultes sur demande spéciale ou en présence de selles liquides. La culture se fait sur un milieu spécifique (milieu Karmali, de Skirrow ou de Butzler) en 24 à 48 heures à 37 °C en atmosphère micro-aérophile.

Examen direct

L'observation microscopique directe de selles diarrhéiques au microscope à contraste de phase peut permettre un diagnostic avec présence de bactéries présentant une mobilité caractéristique en « vol de mouette ».

L'examen après coloration de Gram met en évidence des petits bacilles à Gram négatif incurvés.

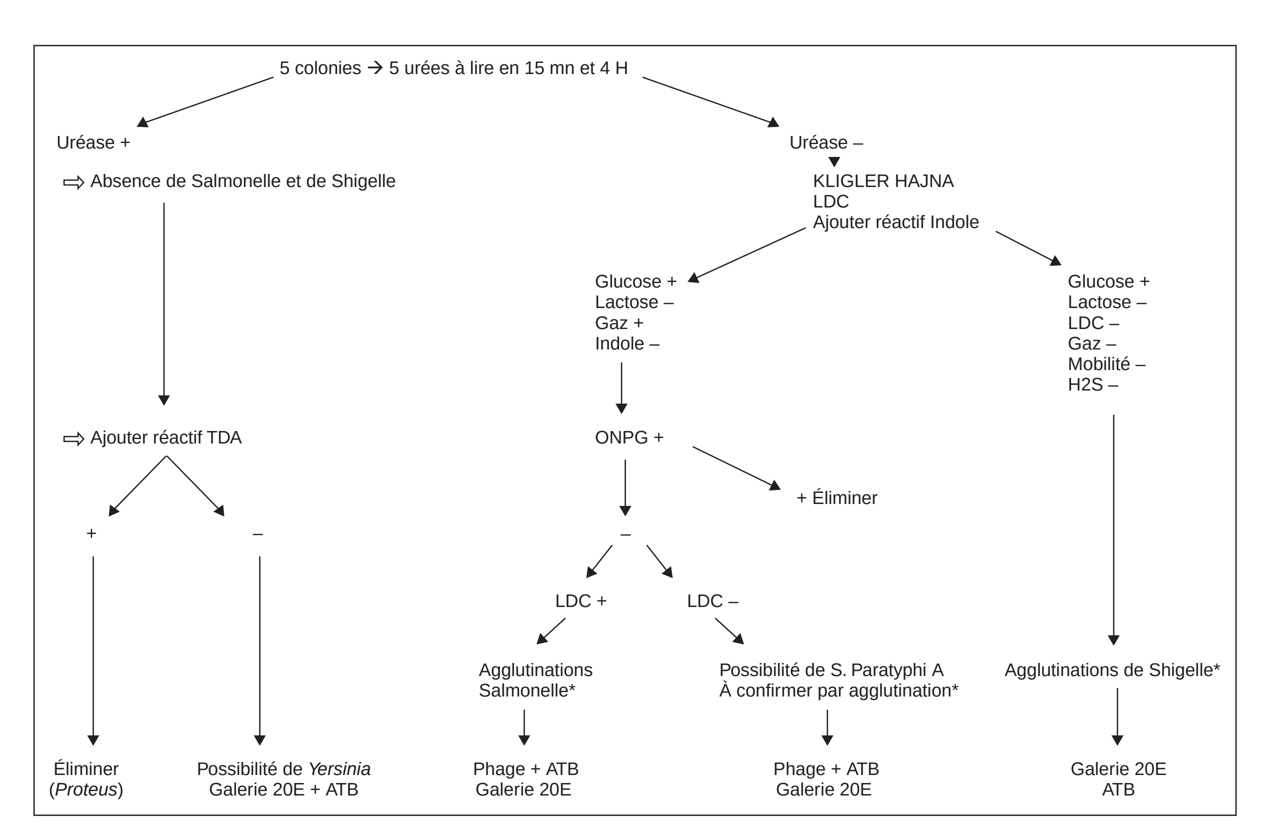


Fig. 15.4 Démarche diagnostique pour la mise en évidence des salmonelles et des shigelles.

Aspect des colonies

Après 48 heures d'incubation, les colonies suspectes sont repérées. Selon l'humidité du milieu, on retrouve de petites colonies grisâtres convexes à bords réguliers ou des colonies plates muqueuses de forme irrégulière.

- *C. fetus* : colonies petites, rondes, transparentes.
- *C. jejuni* : colonies grises, humides, plates et qui ont tendance à s'étaler après 48 heures d'incubation à 37 °C.

Identification

L'identification de l'espèce peut être réalisée par spectrométrie de masse. Dans le cas contraire (tableau 15.4), les caractères suivants sont recherchés :

- oxydase + ;
- très mobiles en « vol de mouette » ;
- petits bacilles à Gram négatif incurvés avec des formes en S ;
- test à l'hippurate : à partir d'une culture riche sur gélose chocolat Isovitalex® ; suspension laiteuse dans 0,25 ml de NaCl + un disque d'hippurate :
  - incuber 4 heures à 37 °C ;
  - lecture : ajouter 5 gouttes de ninhydrine ;
  - réincuber 10 à 15 minutes (maximum) à 37 °C ;
  - test + : bleu foncé ;
  - test – : incolore, jaune léger, bleu très clair ;
  - envoi de la souche au CNR *Campylobacter–Helicobacter*.

Recherche de *Yersinia* spp.

Sur le milieu spécifique pour *Yersinia* figure 15.5, il faut repérer les colonies suspectes :

- en 18 à 24 heures, les colonies de *Yersinia* sont petites (1 mm), à centre rouge entouré d'une zone translucide à contours irréguliers (dit en « œil de bœuf ») ;
- en 48 heures : les colonies de *Yersinia* ont un diamètre de 2 à 3 mm et sont entourées d'une zone de précipités de sels biliaires.

L'identification de l'espèce peut être réalisée par spectrométrie de masse. Dans le cas contraire, les caractères suivants sont recherchés après avoir repiqué les colonies suspectes sur gélose trypticase-soja, incubation à 28 °C (± 2 °C) 18 à 24 heures. En effet, la recherche d'uréase à partir du milieu spécifique *Yersinia* peut donner de faux négatifs.

Le lendemain, faire une recherche d'uréase à partir des colonies de la gélose trypticase-soja. La recherche est positive dans les 4 heures (peut être parfois plus rapide : 10 minutes).

Si l'uréase est positive : faire une galerie API 20 E® (permet une identification fiable du genre et non de l'espèce), un antibiogramme d'entérobactérie et un Kligler-Hajna. Incuber de 18 à 24 heures à 28 °C (± 2 °C).

Recherche de *Clostridium difficile*

Clostridium difficile, bacille à Gram positif anaérobie strict, est à l'origine de colites pseudomembraneuses ou de diarrhées postantibiotiques. Cet agent est majoritairement impliqué dans les diarrhées nosocomiales, en particulier chez l'adulte. Le portage digestif asymptomatique de *C. difficile* est estimé à 3 % dans la population adulte, mais il peut atteindre 15 à 25 % des sujets après un traitement antibiotique ou un séjour dans une unité à forte endémicité. En revanche, un taux de portage élevé est habituellement observé chez les jeunes enfants : 50 à 70 % des enfants de moins de 2 ans sont colonisés.

Les deux facteurs principaux de virulence sont la toxine A et la toxine B. Ce sont des exoprotéines de grande taille.

- La toxine A est nommée entérotoxine, car fortement entérotoxique dans le modèle de l'anse ligaturée de lapin ; elle possède également une activité cytotoxique.
- La toxine B ou cytotoxine est mille fois plus puissante que la A.

Ces toxines inactivent des protéines régulatrices du cytosquelette d'actine (monoglycosylation des protéines Rho).

Les souches non toxinogènes sont considérées comme non virulentes.

Le diagnostic bactériologique repose sur la recherche des toxines. On retiendra qu'il s'agit d'un examen demandé spécifiquement dans un contexte clinique particulier. Le diagnostic bactériologique, mise en évidence de toxines et culture, est détaillé dans le chapitre 37.3.

La grande majorité des souches produisent simultanément les toxines A et B. Leur mise en évidence directement à partir des selles est un excellent marqueur de la présence d'une souche toxinogène de *C. difficile*.

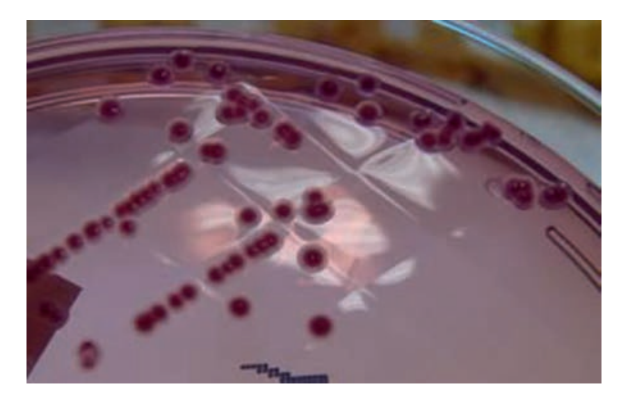


Fig. 15.5 Aspect des *Yersinia* sur milieu spécifique.

Tableau 15.4 **Diagnostic différentiel entre les espèces de *Campylobacter*.**

	Catalase	Oxydase	25 °C	42 °C	Hippurate	Céfalotine	Acide nalidixique	H2S (Kligler)
C. fetus	+	+	+	–	–	S	R	–
C.jejuni	+	+	–	+	+	R	S	–
C.coli	+	+	–	+	–	R	S	+

Recherche des différents pathovars d'*Escherichia coli*

Les différents pathovars responsables de diarrhées ainsi que leurs sérotypes, les gènes de virulence qui leur sont associés et leur principe d'identification sont résumés dans le tableau. 15.5.

Mise en évidence des *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC)

Il était classique de rechercher, en plus des bactéries responsables de diarrhées, les EPEC, dans les selles liquides de nourrissons présentant un tableau de fièvre avec déshydratation. Le rôle de ces bactéries est actuellement discuté. Dans cette tranche d'âge, les causes principales restent d'origine virale : Rotavirus, Adenovirus. Cette recherche n'est actuellement plus recommandée.

Mise en évidence des *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)

Les EHEC (Fig. 15.6), encore appelés *E. coli* producteurs de shigatoxines (*shiga-toxin producing E. coli* [STEC]) ou *E. coli* producteurs de vérotoxines (*verotoxin producing E. coli* [VTEC]), sont des agents pathogènes associés à des manifestations digestives allant de la diarrhée aqueuse bénigne à la colite hémorragique, pouvant évoluer vers un syndrome hémolytique et urémique (SHU), en particulier chez l'enfant. Le SHU lié à EHEC est létal dans 3 à 5 % des cas et est la première cause d'insuffisance rénale aiguë chez les jeunes enfants dont un tiers conserveront des séquelles rénales. La virulence des EHEC est étroitement liée à la production d'une toxine appelée shigatoxine (Stx). Bien qu'associée le plus souvent à de nombreux autres facteurs de virulence, notamment ceux caractéristiques des *E. coli* entéropathogènes (EPEC) dont le gène *eae* du locus LEE (*locus of enterocytes effacement*), seule la mise en évidence de la toxine ou de ces gènes permet d'affirmer que l'on est en présence d'un EHEC. Cinq sérotypes majeurs sont rencontrés en Europe, O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8 et O145:H28, mais de nombreux autres sérotypes sont impliqués. En 2011, un EHEC de sérotype particulier, O104:H4, a été responsable d'une épidémie majeure internationale. Cette souche présentait un génotype de virulence hybride combinant le pathotype EHEC et le pathotype d'*E. coli* entéroaggrégatif.

Deux types de toxines Stx, Stx1 et Stx2, peuvent être produites, codées respectivement par les gènes *stx1* et *stx2*. Trois variants Stx1 et au moins 6 variants Stx2 ont été identifiés. Le type de variant reflèterait à la fois l'origine des souches (bovins, ovins, porcins), et leur pouvoir pathogène, notamment leur implication dans la survenue et la gravité d'un SHU.

Les principaux modes de transmission des EHEC à l'homme sont la consommation d'aliments et d'eaux contaminés, la

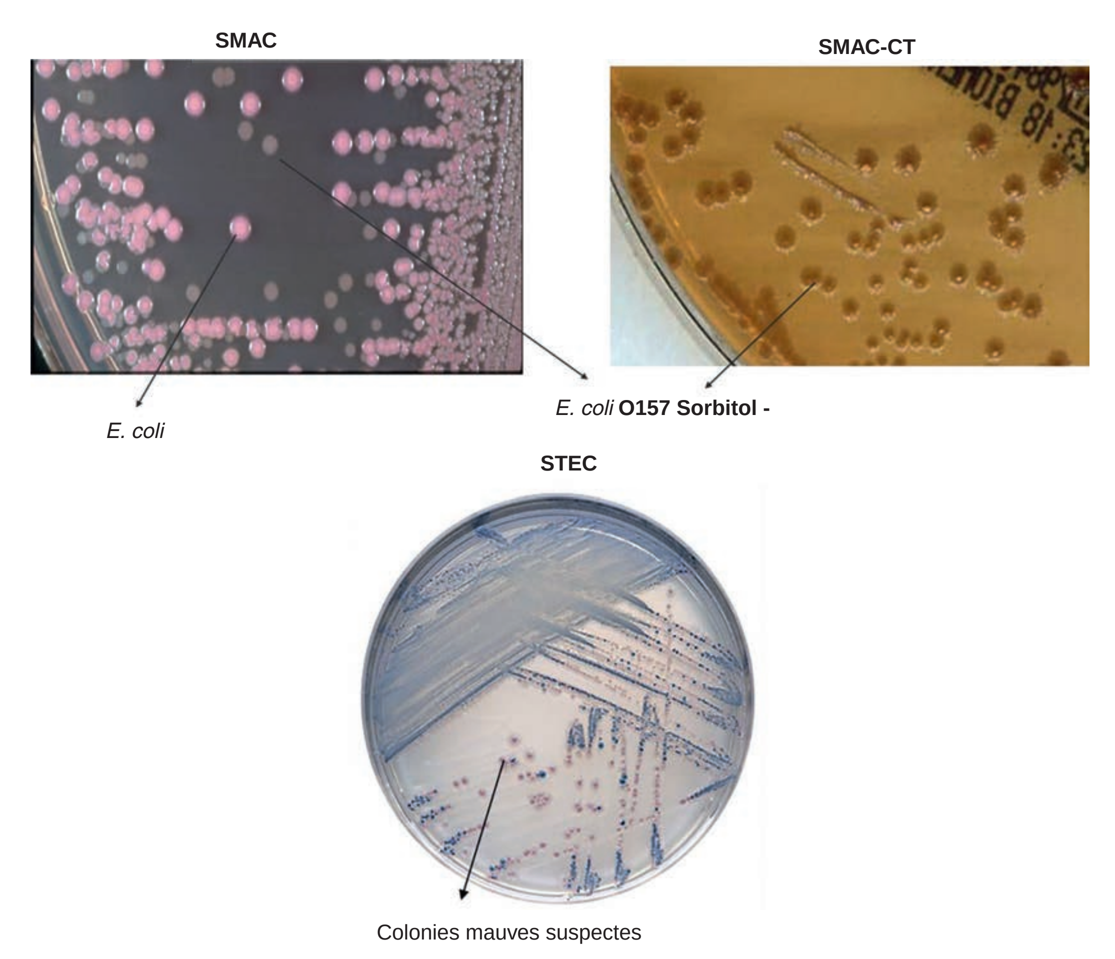


Fig. 15.6 Aspect des colonies d'*E. coli* O157:H7 et des producteurs de shigatoxine (STEC) sur milieux chromogènes.

Tableau 15.5 **Caractéristiques des principaux pathovars d'*Escherichia coli* impliqués dans les diarrhées.**

Nom	Acronymes français (anglais)	Pathologie	Sérogroupes O associés	Facteurs de virulence	Support génétique	Principes d'identification
E. coli entéropathogène	ECEP (EPEC)	Épidémies de diarrhées infantiles aqueuses fébriles	26, 55, 86, 111, 114, 119, 124, 125, 126, 127, 128, 142	Intimine (attachement–effacement)	Locus LEE (gènes *eae*, *tir*)	Sérotypage (kit commercialisé)
				Fimbriae BFP (adhésion)	Plasmide pEAF (gène *bfp*)	PCR des gènes *eae* ou *bfp*
E. coli entérohémorragique	ECEH (EHEC, STEC)	Colites hémorragiques sporadiques ou épidémiques, SHU, PTT	157, 26, 111	Intimine (attachement–effacement)	Locus LEE (gènes *eae*, *tir*)	Sérotypage (kit commercialisé)
				Shigatoxines STX1 et STX2	Phages (gènes *stx1*, *stx2*)	PCR des gènes *stx1* et *stx2*
				Entérohémolysine	Plasmide pO157 (gène *ehxa*)	
E. coli entérotoxinogène	ECET (ETEC)	Diarrhées infantiles aqueuses (tiers-monde), « tourista »	6, 8, 15, 20, 25, 27, 63, 78, 80, 85, 115, 128, 139, 148, 153, 159, 167	CFA (adhésion), entérotoxines ST (thermostable) et LT (thermolabile)	Plasmidique (gènes *cfa*, *est*, *elt*)	PCR des gènes *est* et *elt*
E. coli entéro-invasif	ECEI (EIEC)	Syndrome dysentérique	28, 29, 124, 136, 143, 144, 152, 164, 167	Invasines Ipa, *inter cell spread*, entérotoxine ShET2	Plasmide pINV (locus *ial* : gènes *ipa*, *icsA*)	Kératite du cobaye (test de Sereny), PCR de détection du plasmide pINV
E. coli entéro-aggrégatif	ECEAg (EAggEC)	Diarrhées infantiles persistantes (tiers-monde)	3, 4, 7, 9, 15, 21, 51, 55, 59, 77, 86, 91, 92, 106, 111, 126, 127	*Fimbriae* AAF (adhésion), entérotoxines EAST, Pet	Plasmide pAA (gène *aaf*)	
E. coli à adhésion diffuse	ECAD (DAEC)	Rôle pathogène discuté	4, 15, 28, 44, 50, 55, 69, 75, 86, 125, 126, 127, 128	Adhésines Afa, AIDA		

PTT : purpura thrombopénique thrombocytopénique ; SHU : syndrôme hémolytique et urémique.

transmission interhumaine et le contact avec des animaux porteurs, en particulier les bovins qui représentent le réservoir principal de EHEC. Les infections à EHEC peuvent donc survenir sur le mode sporadique ou épidémique.

L'histoire naturelle de l'infection à EHEC est caractérisée par une période d'incubation d'en moyenne 3 à 4 jours, puis l'apparition d'une diarrhée initialement aqueuse qui devient rapidement sanglante dans 90 % des cas. Dans 5 % des cas sporadiques et 20 % des cas lors d'épidémies, la diarrhée se complique d'un SHU qui apparaît le plus souvent une semaine après le début des symptômes. Le SHU est défini par l'association d'une anémie hémolytique avec présence d'hématies fragmentées (schizocytes), d'une thrombopénie et d'une insuffisance rénale aiguë. Il correspond à des lésions de microangiopathie thrombotique touchant principalement les reins, mais également d'autres organes. Le SHU fait l'objet d'une surveillance à travers un réseau national coordonné par l'Institut national de veille sanitaire (InVS).

Le diagnostic d'infection à EHEC dans un contexte évocateur est indispensable car celle-ci implique une prise en charge spécifique à plusieurs titres. Les infections à EHEC ont la particularité d'être potentiellement aggravées par la prise d'antibiotiques. En effet, certaines classes d'antibiotiques comme les bêta-lactamines ou les fluoroquinolones favoriseraient l'évolution d'une diarrhée à EHEC vers un SHU. Certains SHU dits atypiques ne sont pas liés à la présence de shigatoxines mais à des anomalies de l'activation du complément. Ces deux formes de SHU ont une prise en charge différente.

Enfin, en raison de l'origine le plus souvent alimentaire des infections à EHEC, de leur évolution parfois fatale et de leur risque potentiellement épidémique, la détection d'EHEC, en particulier lorsqu'ils sont responsables de SHU, peut conduire à la mise en œuvre d'une enquête diligentée par l'InVS afin d'identifier la source de contamination.

Pour poser le diagnostic formel d'infection à EHEC et établir une prise en charge adaptée, il faut mettre en évidence la shigatoxine dans les selles par la détection soit de la toxine elle-même, soit des gènes codant cette toxine. L'objectif secondaire est d'isoler la souche d'EHEC permettant sa caractérisation et donc l'investigation d'un éventuel phénomène épidémique.

Prélèvements

La recherche d'EHEC doit être faite sur un prélèvement de selles réalisé le plus tôt possible au cours de l'évolution de la maladie, notamment dans un contexte de SHU, les EHEC étant éliminés le plus souvent en 4 à 6 jours. Paradoxalement, certains SHU liés à une infection à EHEC se caractérisent par un arrêt du transit intestinal après une phase diarrhéique. Il est préconisé dans ce cas de réaliser un prélèvement par écouvillonnage rectal. Le prélèvement, pratiqué avant toute prise d'antibiotique, doit être transporté rapidement au laboratoire, ou conservé à 4 °C ± 2 °C au maximum 24 heures ou à 4 °C ± 2 °C en milieu de conservation type Cary Blair qui peut servir de milieu de transport si l'analyse n'est pas réalisée sur place.

Méthodes

Mise en évidence de la toxine ou de ses gènes

Effet cytopathogène La technique de référence historique pour la recherche de toxines Stx libres dans les selles ou à partir de souches isolées est la cytotoxicité sur cellules Vero ou HeLa, qui doit être neutralisée par un antisérum anti-Stx pour affirmer que la cytotoxicité observée est bien liée à la présence d'une activité toxique de type Stx. Ce test est spécifique, mais il est difficile à mettre en œuvre et n'est effectué qu'en laboratoire spécialisé.

Méthodes moléculaires L'amplification génique par PCR des gènes *stx* représente la méthode de choix. Elle constitue la méthode la plus sensible pour détecter les EHEC à partir des selles. Elle pourra être réalisée après extraction de l'ADN à partir des selles en utilisant une méthode d'extraction adaptée. Toutefois, compte tenu de la présence en très faible quantité des EHEC dans les selles, il est recommandé de réaliser la PCR sur un bouillon d'enrichissement des selles (eau peptonée ou trypticase soja) de 4 à 6 heures pour une réponse rapide ou durant 18 à 24 heures à 37 °C ± 2 °C.

La PCR en temps réel, qui est plus spécifique et plus rapide que la PCR conventionnelle, doit être favorisée. Plusieurs kits de PCR temps réel sont commercialisés. Il est possible de mettre en place une PCR « maison » en utilisant les amorces et les sondes préconisées par l'European Food Safety Authority (EFSA). Quelle que soit la méthode utilisée, celle-ci doit permettre de détecter à la fois les gènes de la toxine Stx1 et Stx2 ainsi que les principaux variants de ces toxines rencontrés en pathologie médicale (stx1a, stx1b, stx1c et stx2a, stx2b, stx2c, stx2d).

La recherche par PCR d'autres facteurs de virulence associés aux EHEC n'est pas indispensable. Toutefois, de rares cas de SHU ont été décrits associés à des souches *eae* +, *stx* –, suite à la perte du locus codant la shigatoxine qui peut être très instable chez certaines souches, en particulier les EHEC O26.

En cas de positivité de la PCR du gène *stx*, l'isolement de la bactérie est indispensable dans un but épidémiologique et pour mener des investigations lors de la survenue de cas groupés. Cependant, l'isolement de la souche est parfois très difficile et cette recherche peut être réalisée par le CNR.

Tests immunologiques De nombreux tests immunologiques permettant la détection des EHEC directement dans les selles ou après une phase d'enrichissement en bouillon sont commercialisés : tests EIA (*enzyme immunoassay*), OIA (*optical immunoassay*), immunochromatographie, etc. Ces tests détectent l'antigène O157 et/ou les toxines Stx et sont le plus souvent faciles à mettre en œuvre. Ils présentent le plus souvent une bonne spécificité et constituent, lorsqu'ils sont positifs, une alerte pour le clinicien. Ils doivent cependant être confirmés par une méthode moléculaire. Surtout, leur sensibilité est encore insuffisante et un test immunologique négatif ne permet en aucun cas d'éliminer une infection à EHEC.

Isolement et caractérisation des souches

Les EHEC étant présents en quantité parfois très faible dans les selles, il est indispensable de réaliser un enrichissement des selles en bouillon. Après cette phase d'enrichissement, la selle est mise en culture sur des milieux spécifiques à 37 °C ± 2 °C et les colonies observées entre 18 à 24 heures. La démarche diagnostique est représentée à la figure 15.7.

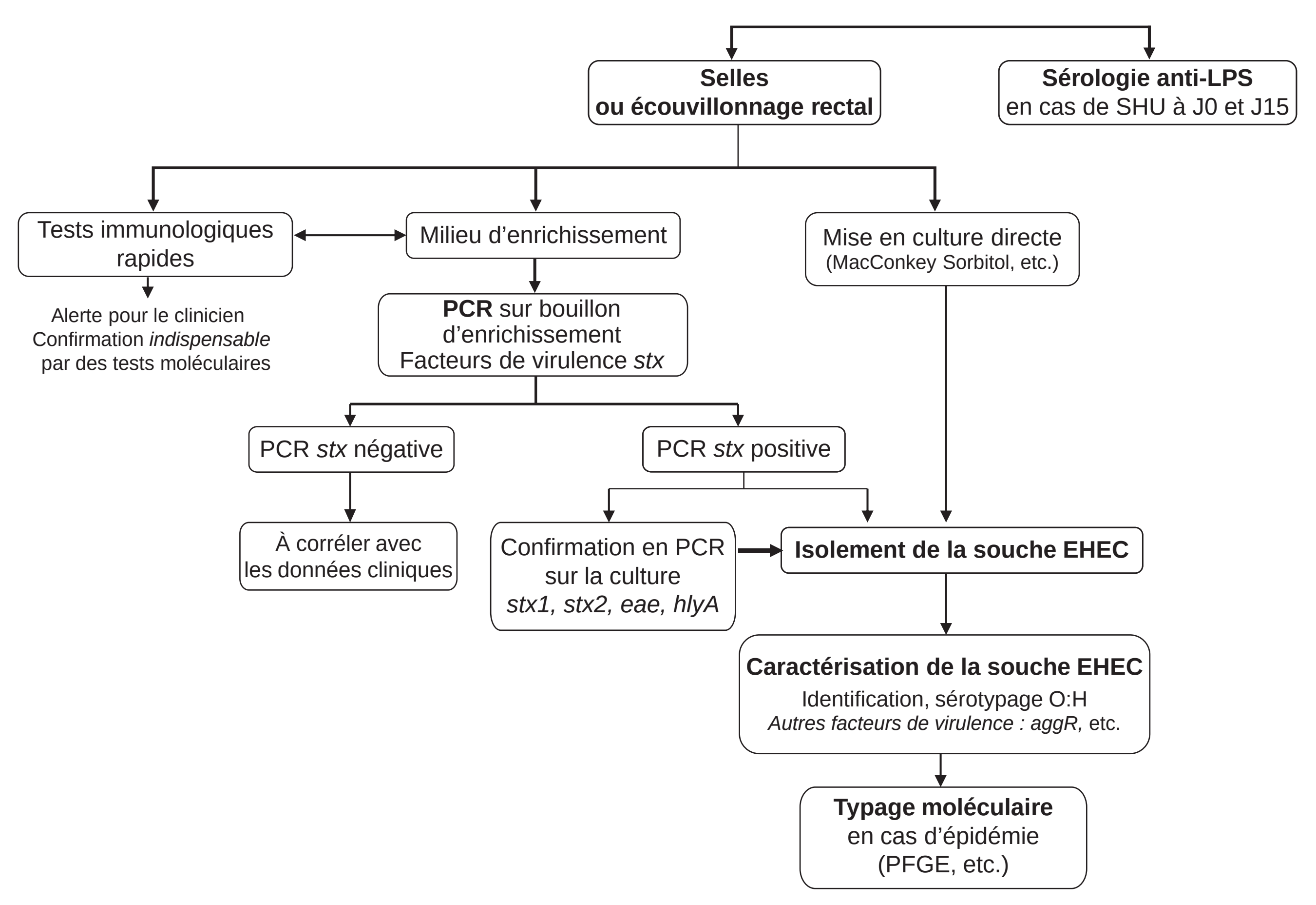


Fig. 15.7 Démarche diagnostique de la recherche d'EHEC. EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique ; SHU : syndrome hémolytique et urémique.

EHEC de sérotype O157:H7 Historiquement, les souches d'EHEC O157:H7 ne fermentent pas le sorbitol et ne produisent pas de β-glucuronidase, ce qui permet l'utilisation de milieux dédiés comme le milieu de Mac Conkey Sorbitol (SMAC) ou le milieu de Mac Conkey Sorbitol-CT (céfixime-tellurite), sur lesquels les colonies suspectes apparaissent transparentes. Cependant, des souches d'EHEC O157:H7 fermentant le sorbitol ont été décrites, notamment en France. Des milieux chromogènes pour la détection des souches STEC ont également été développés ainsi que des techniques de séparation immunomagnétique. Dans tous les cas, les colonies suspectes doivent être agglutinées par un sérum anti-O157 (et éventuellement H7), et il faut confirmer qu'elles appartiennent bien à l'espèce *E. coli*. Toutes les souches O157:H7 ne produisant pas la shigatoxine, il est indispensable de mettre en évidence cette propriété avant de conclure à la présence d'un EHEC O157:H7.

EHEC non O157 Les EHEC non O157 qui représentent actuellement deux tiers des EHEC en France n'ont aucune propriété biochimique commune permettant leur détection sur un milieu particulier. On utilise les milieux traditionnels pour les bactéries entéropathogènes (Drigalski, Hektoen), ainsi que des milieux chromogènes pour entérobactéries. Des milieux chromogènes permettant la mise en évidence de certains sérogroupes non O157 d'EHEC peuvent être d'un appoint utile. Enfin, une gélose au sang de mouton permettant la mise en évidence de l'entérohémolysine, présente chez environ 85 % de EHEC, n'est utilisée que par les laboratoires spécialisés.

La recherche des EHEC non O157 nécessite donc d'avoir recours à des méthodes moléculaires pour rechercher les gènes de virulence sur chaque colonie.

Les anticorps de sérogroupage O des souches peuvent être utiles. L'agglutination des colonies à l'aide d'antisérums spécifiques dirigés contre les antigènes O les plus fréquents des EHEC permet de repérer des colonies suspectes. Une PCR de confirmation sera obligatoirement réalisée.

Étude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques ne doit pas être réalisée en routine. En effet, actuellement, l'utilisation d'antibiotiques n'est pas recommandée dans les diarrhées à EHEC, car elle constitue un facteur de risque de déclenchement d'un SHU par libération de toxines Stx. Seule l'azithromycine pourrait avoir un intérêt et sa place dans l'arsenal thérapeutique vis-à-vis des infections à EHEC est en cours d'évaluation.

Sérodiagnostic

La majorité des malades développent des anticorps anti-LPS, dont la détection est réalisée sur un sérum précoce, et le cas échéant un sérum tardif afin d'observer une augmentation du titre des anticorps attestant de l'infection.

La détection des anticorps anti-LPS de 8 sérogroupes (O157, O26, O91, O103, O111, O128, O145, O104) est réalisée au CNR *Escherichia coli, Shigella* et *Salmonella*. Les trois classes d'anticorps (IgG, IgM et IgA) sont détectables précocement, à un titre souvent très élevé, et permettent d'attester de l'infection même plusieurs semaines après le début des prodromes digestifs.

La recherche de ces anticorps constitue une aide au diagnostic et est utile pour mener des études épidémiologiques lorsque la mise en évidence directe des gènes codant les toxines Stx des EHEC dans les selles est négative, ou n'a pas pu être réalisée.

Conclusion

Le portage sain d'EHEC est exceptionnel et sa présence est donc quasi systématiquement associée à une manifestation clinique en rapport avec sa pathogénicité. Lors d'une demande de coproculture, devant des signes évocateurs d'infections à EHEC, diarrhées sanglantes ou SHU, le biologiste devra systématiquement proposer la recherche de ce pathogène.

Au cours d'un SHU, la recherche négative d'EHEC, en particulier par PCR, doit être interprétée en fonction de l'histoire clinique du patient, en tenant compte en particulier de la prise éventuelle d'antibiotiques et de la durée de l'évolution de la symptomatologie. Ces renseignements devraient systématiquement apparaître sur une demande de recherche d'EHEC. Rappelons que, dans la majorité des cas, EHEC n'est plus détecté au-delà d'une semaine d'évolution d'un SHU.

Dans de rares cas, le portage d'EHEC peut se prolonger plusieurs semaines après la disparition de toute symptomatologie. Ces patients pourraient bénéficier d'une décontamination et l'utilisation d'azithromycine chez ce type de patient pourrait être envisagée.

La mise en évidence d'*E. coli* O157 ou de tout autre sérogroupe caractéristique d'EHEC dans une selle ne permet en aucun cas de lui attribuer la responsabilité d'une symptomatologie de type EHEC. Seule la mise en évidence de la shigatoxine à partir de ces colonies permettra de conclure.

Les colonies suspectes ou confirmées ou les selles en l'absence d'isolement de colonies d'EHEC devront être adressées au CNR ou au CNR associé pour que la caractérisation ou la recherche de ces souches soient réalisées dans un but épidémiologique et potentiellement d'investigation sanitaire.

Mise en évidence des autres pathovars d'*Escherichia coli*

La détection des autres pathovars responsables de diarrhées reste du domaine des laboratoires spécialisés. Initialement fondée sur le pouvoir pathogène chez l'animal ou l'effet cytopathogène en culture cellulaire, l'identification de ces souches est actuellement réalisée par des techniques de biologie moléculaire (Tableau 15.6).

Recherche de germes multirésistants aux antibiotiques

Chez les malades hospitalisés dans des services à risques (réanimation, oncohématologie, etc.), la détection de la colonisation par des bactéries multirésistantes aux antibiotiques est effectuée dans les selles des patients à l'aide de milieux chromogènes contenant des antibiotiques pour les entérocoques résistants à la vancomycine et les entérobactéries productrices de BLSE ou de carbapénémases.

Analyse semi-quantitative des selles

En milieu spécialisé (réanimation, grands prématurés et patients immunodéprimés), il est possible de réaliser une analyse semi-quantitative de la flore fécale afin de prévenir le risque éventuel de septicémie par translocation endogène.

Nouvelles méthodes de diagnostic moléculaire

De nouvelles techniques qualitatives d'amplification génique en temps réel (PCR simplex, duplex ou multiplex) ont été développées par plusieurs laboratoires. Elles permettent la détection de plusieurs pathogènes intestinaux en fonction de l'étiologie bactérienne, virale ou parasitaire : *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., EHEC, *C. difficile* toxinogène, *Norovirus*, *Rotavirus*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Dientamoeba fragilis*, et *Cryptosporidium* spp.

Dans le cas des infections entériques bactériennes, ces techniques permettent d'une part de réduire la durée de la phase technique (une demi-journée) et ainsi le délai de rendu de résultat (à J0), et d'autre part d'augmenter la sensibilité diagnostique. Cependant, la culture des selles doit être systématiquement réalisée pour obtenir les souches des bactéries préalablement détectées par un test positif, obtenir les antibiogrammes correspondants et éventuellement les transférer aux CNR adéquats pour des analyses complémentaires.

Conclusion

Chez un patient diarrhéique, la mise en évidence d'une bactérie réputée pathogène (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp.) dans une coproculture doit être considérée a priori comme pathologique et conduit à la réalisation d'un antibiogramme. Toutefois, il existe des porteurs sains de *Salmonella* spp. et toutes les salmonelloses ne doivent pas conduire à la prescription d'antibiotiques. Par ailleurs, *Y. enterocolitica* n'est pas toujours pathogène (le biotype 1A est considéré comme non pathogène) et l'antibiothérapie des yersinioses doit être restreinte aux patients symptomatiques ou à risque de septicémies.

Dans le cadre de la recherche d'un agent spécifique, l'antibiogramme peut s'avérer indispensable pour le traitement comme pour la détection de souches épidémiques (exemple de *C. difficile* et du clone épidémiques O27 présentant une résistance associée à l'érythromycine et aux fluoroquinolones). En revanche, la réalisation d'un antibiogramme complet sur une souche d'EHEC est inutile, la prescription de la plupart des antibiotiques étant déconseillée dans ce cadre.

Tableau 15.6 **Séquence des amorces nucléotidiques utilisées pour la recherche de toxines produites par les principaux pathovars d'*Escherichia coli.***

Nom	Acronymes français (anglais)	Cibles	Séquences des amorces	Taille du produit	Référence
E. coli entérotoxinogène	ECET (ETEC)	ST (*est*)	TCT GTA TTG TCT TTT TCA CC	186	Frankel 1989
			TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC		
		LT (*elt*)	GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC	750	
			CCG AAT TCT GTT ATA TAT GTC		
E. coli entéro-invasif	ECEI (EIEC)	Locus *ial*	TGG AAA AAC TCA GTG CCT CT	422	Lüscher 1994
			CCA GTC CGT AAA TTC ATT CT		
E. coli entéro-aggrégatif	ECEAg (EAggEC)	Plasmide pAA	CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT	630	Schmidt 1995
			CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T		
E. coli entéropathogène	ECEP (EPEC)	*eae*	TTA ACG GCT ATT TCC GCA TGA G	249	CNR
(et *E. coli* entérohémorragique)			TCG TCA CCA GAG GAA TCG GAG T		
E. coli entérohémorragique	ECEH (EHEC, STEC)	*stx1*	GGA AGA GTC CGT GGG ATT AC	135	CNR
			GAA AGC GAT GCA GCT ATT AAT AAT G		
		stx2	CAA CGG TTT CCA TGA CAA CG	184	
			GTG ACA GTG ACA AAA CGCA G		

Pour en savoir plus

Barbut F, Braun M, Burghoffer B, et al. Rapid detection of toxigenic strains of Clostridium difficile in diarrheal stools by real-time PCR. J Clin Microbiol 2009 ; 47(4) : 1276–7.

Denis F. Diagnostic et contrôle en médecine humaine des toxi-infections alimentaires collectives. Bull Acad Nat Med 2012 ; 196 : 1673–82.

EFSA. Scientific Opinion on VTEC – seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. The EFSA Journal 2013 ; 11(4) : 3138.

European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric. Infectious diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe : Update 2014. JPGN 2014 ; 59 : 132–52.

Frankel G, Giron JA, Valmassoi J, et al. Multi-gene amplification : simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. Mol Microbiol 1989 ; 3 : 1729–34.

Gould LH, Bopp C, Strockbine N, et al. Recommendations for diagnosis of shiga toxin-producing Escherichia coli infections by clinical laboratories. MMWR Recomm Rep 2009 ; 58 : 1–14. RR-12.

Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Infectious Diseases Society of America. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis 2001 ; 32(3) : 331–51.

Haut Conseil de la Santé Publique. Guide des conduites à tenir an cas de maladie infectieuse dans une collectivité d'enfants ou d'adultes. 28 septembre 2012.

Lüscher D, Altwegg M. Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic Escherichia coli using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. Mol Cell Probes 1994 ; 4 : 285–90.

Mariani-Kurkdjian P, Bonacorsi S. Diagnostic des infections à Escherichia coli enterohémorragiques. Feuillets de Biologie 2014 ; 317 : 41–7.

Pawlowski SW, Warren CA, Guerrant R. Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. Gastroenterology 2009 ; 136 : 1874–86.

Rémic. Référentiel en microbiologie médicale. Société française de microbiologie. 2015.

Schmidt H, Knop C, Franke S, et al. Development of PCR for screening of enteroaggregative Escherichia coli. J Clin Microbiol 1995 ; 33 : 701–5.

www.invs.sante.fr/surveillance/tiac/default.htm.

www.sentiweb.fr (épidémiologie des gastro-entérites).

Chapitre 16

Examen cytobactériologique des urines (ECBU)

S. Bonacorsi

PLAN DU CHAPITRE

Données physiopathologiques

L'infection du tractus urinaire (ITU) se caractérise par la multiplication de micro-organismes au sein de l'arbre urinaire (bactériurie) s'accompagnant d'une réaction inflammatoire avec afflux de leucocytes dans l'urine ou leucocyturie. L'ITU se fait quasi exclusivement par voie ascendante et les bactéries responsables d'ITU sont presque toujours d'origine digestive. L'appareil urinaire est normalement stérile, bien que s'ouvrant vers l'extérieur, et la présence de bactéries dans l'urine suffirait donc à définir l'ITU. Mais l'urine est contaminée physiologiquement lors de son émission par les germes du méat et du tiers inférieur de l'urètre ou du périnée. Aussi, l'ECBU se caractérise par une analyse quantitative de la culture de l'urine associée à une analyse quantitative de la leucocyturie.

En outre, l'urine constitue un bon milieu de culture. Aussi, la réalisation et le transport du prélèvement doivent répondre à des règles strictes qui conditionnent l'interprétation de cet examen.

L'ITU est plus particulièrement fréquente chez la femme et la jeune fille en raison d'un urètre court, s'ouvrant à la vulve au voisinage du vagin et de l'anus. Chez le jeune nourrisson avant 3 mois, le sex ratio est inversé. Cette plus forte proportion de garçons serait expliquée par une forte colonisation bactérienne du prépuce à cet âge. Cette colonisation rend compte de la difficulté du prélèvement chez le jeune nourrisson masculin. Le risque d'infection serait moindre chez les garçons circoncis.

Différents facteurs de risque de l'ITU ont été identifiés :

- les anomalies anatomiques : chez l'adulte, il pourra s'agir de tout obstacle présent sur les voies excrétrices (lithiase, hypertrophie prostatique, etc.), et chez l'enfant, de malformations favorisant la stase urinaire avec en particulier le reflux vésico-urétéral ;
- les anomalies fonctionnelles rencontrées notamment chez le patient diabétique, au cours de la grossesse ou chez la personne âgée ;
- enfin, les facteurs iatrogènes, liés à toute intervention sur les voies urinaires avec en particulier le sondage urinaire, pour lequel le risque cumulé d'infection urinaire est de 100 % après 30 jours de sondage [3].

L'ITU peut être limitée à la vessie (cystite) ou se compliquer d'une atteinte rénale (pyélonéphrite) caractérisée par la survenue de fièvre et de douleurs lombaires. L'atteinte du parenchyme rénal fait toute la gravité potentielle de l'infection urinaire. À court terme, elle peut se compliquer de bactériémie avec localisation secondaire ou de choc infectieux. À long terme et en cas de répétition, la pyélonéphrite peut être responsable d'insuffisance rénale et/ou d'hypertension artérielle.

Prélèvement et acheminement

Le mode de prélèvement idéal des urines est la ponction vésicale sus-pubienne (PSP) qui permet d'éviter toute contamination par la flore de l'urètre. Toutefois, cette technique est trop invasive pour être utilisée en première intention. L'alternative à la PSP est représentée par le sondage « aller-retour ». Bien que moins invasive, cette technique n'est pas dénuée de complications. En pratique, le recueil d'urine se fait le plus souvent chez l'adulte coopératif par voie naturelle selon la technique dite du « milieu de jet » et selon des règles strictes qui conditionnent la qualité de l'ECBU [9]. Les urines sont recueillies dans un récipient stérile.

Sujet adulte coopératif et enfant avec miction volontaire

La réalisation du prélèvement sera confiée au patient adulte ou aux parents de l'enfant ; il conviendra donc de leur

fournir des renseignements précis. Les urines sont recueillies de préférence le matin après lavage soigneux des organes génitaux externes avec une solution antiseptique ou un savon doux, et rinçage soigneux à l'eau. Chez une femme qui présente des pertes, même minimes, la mise en place d'une protection vaginale est indispensable. La première partie de la miction sera rejetée, permettant d'éliminer tout ou partie de la flore commensale de l'urètre inférieur, et seul le milieu du jet sera recueilli dans un flacon stérile.

Sujet adulte non coopératif ou incontinent

Le recueil chez la femme sera réalisé par sondage urinaire à l'aide d'une sonde de petit calibre. Cette manœuvre est à éviter chez l'homme car pourvoyeuse de prostatites et on lui préférera le recueil par collecteur pénien, voire par cathétérisme sus-pubien en cas de rétention d'urine [3].

Chez le petit enfant sans miction volontaire

Après un nettoyage soigneux de la région périnéale, un sac plastique collecteur sera fixé au moyen d'un adhésif. Ce sac ne doit pas être laissé plus de 30 minutes. Au-delà de ce temps, on place un nouveau sac après avoir recommencé le nettoyage. Ce mode de prélèvement est entaché d'un taux inacceptable de faux positifs (> 50 %). Aussi, toute analyse d'urine issue de ce mode de prélèvement, suggérant la présence d'une infection urinaire, doit être confirmée par la réalisation d'un sondage. Si celui-ci est aisé chez la fille, il ne devra être réalisé que par un personnel expérimenté chez le garçon en raison du risque de plaie urétrale ; à défaut, une PSP sera réalisée chez le garçon [1].

Chez les porteurs de sonde à demeure

La sonde sera clampée pendant 10 minutes afin de laisser l'urine s'accumuler en amont, puis l'urine sera ponctionnée via l'opercule spécifique de la sonde après désinfection à l'alcool iodé. Il ne faut pas déconnecter le système de drainage qui doit rester fermé. Ce type de prélèvement pratique ne reflète cependant pas toujours la ou les espèces bactériennes présentes dans la vessie, mais plutôt les espèces colonisant la sonde urinaire. C'est pourquoi, dans toute la mesure du possible, on privilégiera le prélèvement juste après un changement de sonde [3]. En aucun cas le sac collecteur ne sera prélevé.

Acheminement

Afin d'éviter toute prolifération bactérienne, le transport au laboratoire se fera en moins de 2 heures. Au-delà de ce délai, le flacon d'urine sera placé dans un récipient contenant de la glace (les urines pourront être gardées 24 heures à 4 °C, en sachant toutefois que la réfrigération ne préserve pas les leucocytes). Un autre moyen permettant d'empêcher toute prolifération bactérienne est de mettre l'urine en présence d'un agent bactériostatique sous forme de poudre comme l'acide borique. Ce système permet une conservation des urines à température ambiante pendant 24 heures sans modification notable du taux de bactérie et sans altération des leucocytes. Ce système, simple mais plus onéreux, nécessite d'obtenir un volume minimal d'urine (5 ou 10 ml) afin que l'agent bactériostatique ne soit pas trop concentré (risque d'effet bactéricide). Enfin, l'acide borique est susceptible de diminuer la sensibilité de la recherche de leucocyte estérase par bandelette urinaire (voir ci-après).

En l'absence de système de prévention de prolifération bactérienne, on pourra utiliser la technique de la lame immergée ensemencée, au lit du malade par l'infirmière. Lame et flacon seront tous deux adressés au laboratoire.

Renseignements accompagnant le prélèvement

Ces renseignements sont indispensables car ils permettront au microbiologiste d'optimiser l'ECBU et son interprétation. Ils concernent l'âge et le sexe du patient, le mode et l'heure du prélèvement, les motifs de la demande, les antécédents d'ITU, la notion de maladie concomitante, le traitement éventuellement déjà institué.

Techniques d'analyse au laboratoire

Les urines doivent être analysées sans retard. Les urines sont normalement jaune clair et doivent être limpides. L'émission d'urines troubles suggère une infection urinaire, mais n'est cependant pas spécifique ; elle peut être liée à la présence de cristaux, de médicaments, etc.

Examen microscopique

Détermination de la leucocyturie

En théorie, la technique de choix pour détecter une leucocyturie anormale est la mesure du taux d'excrétion des leucocytes ou compte d'Addis. Le sujet, au repos, vide sa vessie puis absorbe un grand verre d'eau. On recueille les urines des 3 heures suivantes. Le compte d'Addis représente le nombre d'éléments par millilitre multiplié par le volume de la diurèse en millilitre, pendant 3 heures divisé par 180 minutes. Normalement, il y a moins de 5000 leucocytes/min, et moins de 5000 hématies/min. Toutefois, en raison de la lourdeur de sa réalisation, le compte d'Addis (ou hématies leucocytes-minute) reste réservé à la surveillance des néphropathies interstitielles.

En pratique, la numération des leucocytes s'effectue sur un échantillon d'urine en utilisant un hématimètre ou « cellule » calibrée. D'abord, on procède à une homogénéisation des urines sur un agitateur type Vortex®. La numération des éléments figurés se fait dans un hématimètre en verre de Nageotte, Lemaur, ou Malassez, permettant la numération dans des volumes respectivement de 50, 40 et 1 mm^3. Le système Kova® slide est une lame en plastique qui a l'avantage d'être jetable et de contenir 10 cellules de 1 mm^3 par lame. Le résultat est exprimé en hématies et leucocytes par mm^3, ou plus volontiers par millilitre (unité reconnue internationalement). Une urine normale contient moins de 10 leucocytes par mm^3. Les cellules ne sont pas toutes d'origine vésicale. L'identification des cellules est possible ; elle sera précisée par l'étude du culot urinaire. On doit distinguer

les lymphocytes et les polynucléaires (souvent altérés et en amas). On rencontre aussi des cellules rondes rénales, des cellules en raquette de la couche moyenne de l'épithélium vésical, de grandes cellules à petits noyaux d'origine vaginale.

Détermination du taux d'hématies

La numération des hématies sera systématiquement réalisée. La présence d'un taux anormal d'hématies dans un contexte infectieux peut se rencontrer au cours d'ITU à bactéries lithogènes *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp., ou *Corynebacterium urealyticum.*

Autres analyses

L'examen microscopique de l'état frais permet de mettre en évidence la présence :

- de cylindres : les cylindres ont pour origine la lumière tubulaire rénale. Ils peuvent être hyalins et sont alors principalement composés de la protéine de Tamm-Horsfall qui est une défensine de l'arbre urinaire. Ces cylindres sont physiologiques. Les cylindres pathologiques contiennent des hématies et/ou des leucocytes (cylindres hématiques et/ou leucocytaires). Leur présence permet d'identifier le rein comme la source de l'hématurie et/ou de la leucocyturie ;
- de cristaux médicamenteux, d'oxalate de calcium, d'acide urique, phospho-ammoniaco-magnésien. Ces derniers signent la présence d'une lithiase secondaire à une infection liée à une bactérie productrice d'uréase (notamment *Proteus mirabilis, Corynebacterium urealyticum*) et qui provoque une alcalinisation des urines ;
- de levures, *Trichomonas*, spermatozoïdes, œufs de parasites (*Schistosoma haematobium*) ou bactéries.

Examen direct après coloration

L'examen direct, après coloration de Gram, d'une urine non centrifugée ne présente une sensibilité proche de 100 % que pour des concentrations bactériennes de l'ordre de 10^5 UFC/ml [9]. Malgré une sensibilité médiocre, cet examen reste indispensable en apportant des informations immédiates au clinicien sur le type de bactéries impliquées ou la présence de levures permettant d'adapter le traitement. En cas de présence d'une flore polymorphe, l'examen direct permettra d'évoquer une contamination du prélèvement et de faire aussitôt pratiquer une autre analyse. De plus, dans certains cas, notamment lors de culture stérile avec examen direct positif, il permettra d'adapter les milieux de culture, l'atmosphère et le temps d'incubation pour la recherche de germes inhabituels.

Bandelettes réactives chimiques

Ces bandelettes permettent de détecter simultanément et rapidement la présence de leucocytes et de bactéries sur des urines fraîchement émises.

Les leucocytes sont mis en évidence grâce à la détection d'une leucocyte estérase provenant à la fois des leucocytes intacts et des leucocytes lysés. Le seuil de détection est d'environ 10 leucocytes par mm^3. Des faux positifs sont possibles en cas de contamination par la flore vaginale ou de présence de *Trichomonas*. La sensibilité du test est diminuée en cas de forte glycosurie ou protéinurie, ou en présence d'acide borique, d'acide ascorbique ou d'acide oxalique. Enfin, les céphalosporines de première génération et les tétracyclines peuvent provoquer des faux négatifs [9].

Les bactéries produisant une nitrate réductase sont détectées par la recherche de nitrites. La principale limite de ce test est qu'il ne peut détecter que les entérobactéries (toutes productrices de nitrate réductase) et non les bactéries à Gram positif telles que les entérocoques et les staphylocoques. Le seuil de détection est de 10^5 UFC/ml. Toutefois, ce seuil n'est atteint que si les urines ont séjourné suffisamment longtemps dans la vessie (> 4 heures) pour permettre aux bactéries de convertir suffisamment de nitrates en nitrites pour être détectés. En pratique, il est recommandé de tester les urines du matin. Des faux négatifs sont possibles en cas de bactériurie faible, de régime restreint en nitrates, de pH urinaire acide, de traitement diurétique ou de traitement par acide ascorbique.

L'association des deux tests pour la détection des infections urinaires permet de pallier les défauts de sensibilité de chacun. Ainsi, l'absence simultanée de nitrites et de leucocyte estérase présente une très bonne valeur prédictive négative (> 95 %) chez la femme ou l'enfant sans facteur de risque associé. Une « bandelette négative » chez ces patients sans facteur de risque associé permet d'éliminer raisonnablement le diagnostic d'infection urinaire et de ne pas réaliser un ECBU. En revanche, chez l'homme, c'est la valeur prédictive positive qui est intéressante (90 %) alors qu'une bandelette négative ne permet pas d'éliminer une ITU.

Notons enfin que la performance du test de la bandelette dépend du respect strict des temps de lecture. Dans le but de standardiser cette lecture, elle peut être réalisée par des petits automates. Ces derniers présentent l'avantage, en plus, d'éditer un résultat sur papier qui permet d'avoir une trace écrite du résultat dans le dossier du patient.

Uroculture, à la fois quantitative et qualitative

Choix des milieux

La très grande majorité des bactéries responsables d'infections urinaires ne sont pas exigeantes et sont cultivées sur géloses ordinaires (Tableau 16.1).

Milieux non chromogènes

Initialement, les milieux les plus usuels étaient adaptés à la croissance des entérobactéries avec le plus souvent un indicateur de l'attaque du lactose permettant une différenciation des colonies. Les milieux les plus utilisés étaient soit non sélectifs – milieu de CLED et milieu lactosé au bromocrésol pourpre –, soit sélectifs – milieu de MacConkey. L'utilisation d'un milieu sélectif pour les bactéries à Gram négatif rendait impératif l'ensemencement d'une gélose adaptée aux bactéries à Gram positif telle qu'une gélose au sang avec ou sans inhibiteurs type acide nalidixique plus colimycine.

Milieux chromogènes

Le principe du milieu chromogène est d'utiliser des substrats synthétiques qui sont des analogues structuraux d'une molécule naturellement clivée par une enzyme caractéristique

Tableau 16.1 Espèces responsables d'infections urinaires (proportion en %).

Espèces bactériennes	Infections communautaires Réseau AFORCOPI-BIO Rapport Onerba 2002 (*n*=417)	Infections nosocomiales Groupe d'étude ESCMID Europe 2000 (*n*=421)	Infections SAU d'un hôpital pédiatrique 2005 (*n*=221)
Gram négatif			
Escherichia coli	68	38	79
Proteus mirabilis	8	7	9
Klebsiella spp.	5	9	3
Pseudomonas aeruginosa	1	6	0,5
Autres entérobactéries	3	7	1
Acinetobacter spp.		2	
Gram positif			
Enterococcus spp.	5	17	3
Staphylococcus saprophyticus	3		0,5
Staphylococcus aureus	3	2	2
Streptococcus agalactiae	3		1
Autres	1	2	1
Levures		10	

SAU : service d'accueil des urgences.

d'une espèce bactérienne ou d'un groupe d'espèces bactériennes. Le substrat clivé acquiert des propriétés chromogéniques et précipite en colorant la colonie sans diffuser dans la gélose. La plupart des milieux chromogènes utilisent un jeu de différents substrats permettant une très bonne différenciation des colonies et une identification présomptive de l'espèce ou des espèces bactériennes présentes dans l'urine. Aujourd'hui, les milieux chromogènes, bien que plus onéreux, ont largement supplanté les milieux non chromogènes en raison de plusieurs avantages. Ces milieux permettent une discrimination plus fine des colonies et donc une meilleure sensibilité de détection des urines polymicrobiennes. Ils permettent une identification directe d'*E. coli*, d'*Enterococcus* spp. et de *Proteus mirabilis*, à l'aide de tests complémentaires simples (indole, état frais) permettant un rendu d'identification plus rapide au clinicien et une éventuelle adaptation de l'antibiothérapie probabiliste (Fig. 16.1). Ils permettent une économie substantielle en réactifs et en temps-technicien. Il est à noter toutefois que, dans de rares cas, ce système d'identification peut être pris en défaut. Ainsi, par exemple, de rares souches de *Citrobacter freundii* indologènes dépourvues de β-D-glucosidases peuvent être identifiées à tort comme *E. coli* (Tableau 16.2). Par ailleurs, quelques souches d'*Enterobacter* spp. et de *Citrobacter* spp. ont été décrites avec un phénotype de β-D-glucuronidase. Le microbiologiste, notamment en milieu hospitalier du fait de la plus grande diversité des entérobactéries rencontrées, devra donc rester vigilant et bien contrôler l'adéquation entre l'identification et l'antibiogramme. Un autre risque est représenté par la possibilité de confondre un entérocoque et un streptocoque du groupe B qui peut être responsable d'infection urinaire chez la femme enceinte ou le nouveau-né. Chez ces patients, l'utilisation en parallèle d'une gélose au sang apparaît souhaitable. La quasi-généralisation des systèmes d'identification par spectrométrie de masse type MALDI-TOF permet une identification rapide et fiable des bactéries isolées lors d'une uroculture.

Autres milieux

D'autres milieux seront utilisés en fonction du contexte clinique ou en fonction du Gram :

- en cas de suspicion de tuberculose, la recherche de *M. tuberculosis* sera réalisée sur les milieux adéquats (voir le chapitre 34 consacré aux mycobactéries) ;
- en cas de cystite hémorragique chez des patients immunodéprimés, on recherchera *Corynebacterium urealyticum* en ensemençant une gélose au sang et en prolongeant l'incubation au-delà de 24 heures ;
- en présence de bactéries à Gram positif à l'examen direct, une gélose au sang sera systématiquement ensemencée ;
- en présence de germes à l'examen direct et en l'absence de culture en 24 heures, une recherche d'anaérobies et de germes exigeants sera réalisée en ensemençant une gélose au sang incubée en anaérobiose durant 48 heures et une gélose « chocolat » sous CO_2 durant 48 heures ;
- en présence de levures, un milieu Sabouraud ou un milieu chromogène pour levures (permettant l'identification présomptive de *C. albicans* notamment) sera ensemencé et incubé à 30 °C.

Modes d'ensemencement

L'ensemencement doit répondre au double but de dénombrer les bactéries et d'isoler la ou les bactéries en cause en obtenant des colonies bien distinctes les unes des autres.

- **Méthode originale de Kass :** on fait des dilutions en série de 10 en 10. Un volume connu de chaque dilution est étalé sur une boîte de Petri.
- **Méthode simplifiée de Véron :** l'urine est diluée au 1/100e en eau distillée stérile. On étale 0,1 ml de cette dilution. Une colonie correspond à 1000 bactéries par millilitre.
- **Méthode de l'anse calibrée :** cette méthode est actuellement la plus utilisée. L'urine est prélevée à l'aide d'une anse de 10 μl et est ensemencée selon une méthode standardisée qui permet, grâce a un abaque, de convertir l'aspect de la culture en UFC par millilitre, et ce sans dénombrement (Fig. 16.1). Cette méthode simple, sans dilution préalable, permet une numération de 10^3 à 10^6 UFC/ml tout en permettant l'obtention de colonies isolées.
- **Méthode de la lame immergée :** on plonge dans l'urine fraîchement émise une lame portant des milieux nutritifs, généralement MacConkey et CLED. Cette méthode

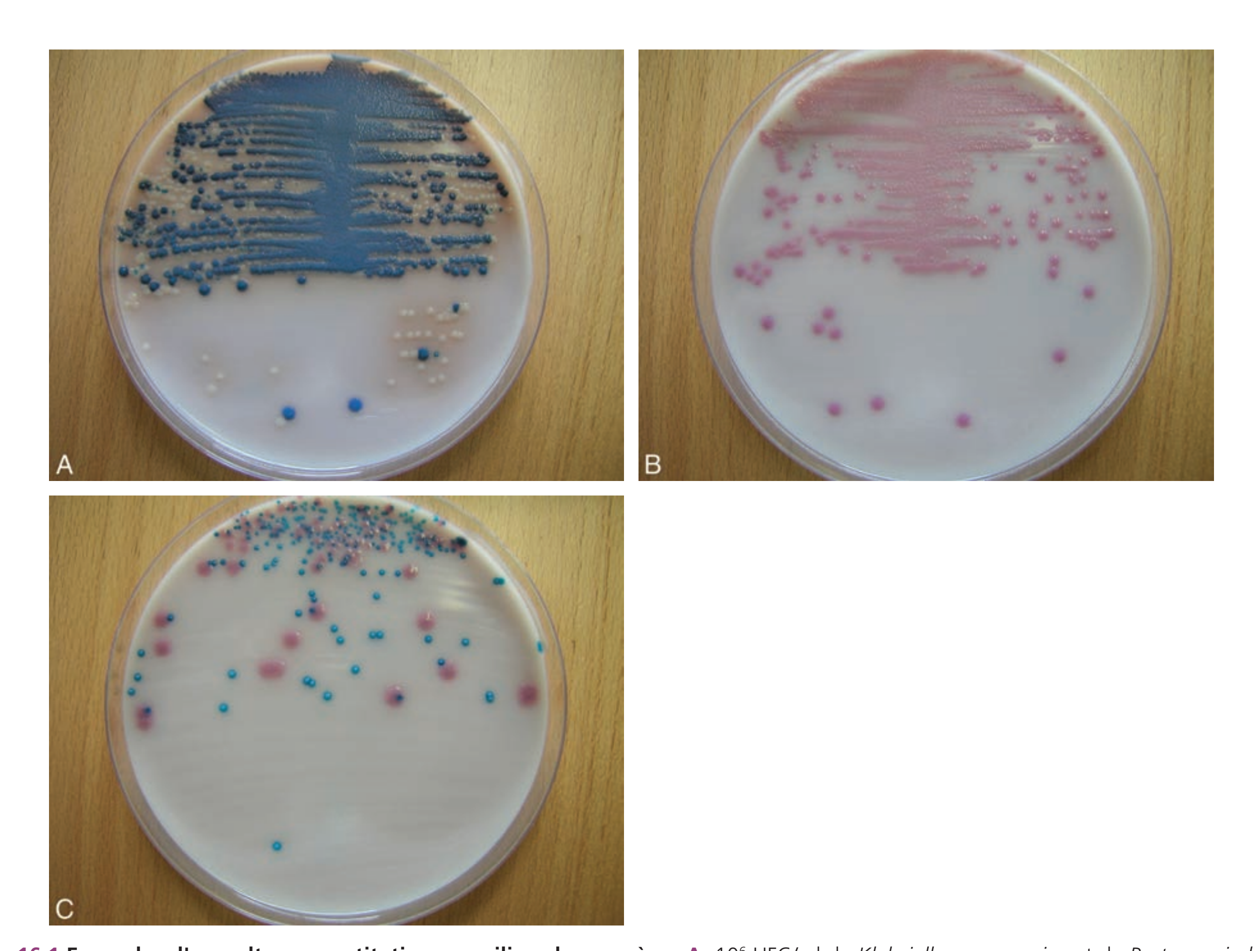


Fig. 16.1 Exemples d'uroculture quantitative sur milieu chromogène. **A.** 10^6 UFC/ml de *Klebsiella pneumoniae* et de *Proteus mirabilis*. **B.** 10^5 UFC/ml d'*Escherichia coli*. **C.** 10^4 UFC/ml d'*Escherichia coli* et de streptocoque du groupe D.

Tableau 16.2 Milieux chromogènes et ECBU : enzymes recherchées et aspect des colonies.

	Espèces ou groupe d'espèces bactériennes			
Enzyme détectée Réaction chromogénique	***E. coli****	**Groupe *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter***	**Groupe : *Proteus**, Morganii, Providencia***	***Enterococcus***
β-D-glucuronidase [1] → colonie rose	+	–	–	–
β-D-galactosidase [2] → colonie rose	+	+	–	–
β-D-glucosidases [3] → colonie bleue	–	+	–	+
Tryptophane désaminase [4] → pigmentation beige de la gélose	–	–	+	–

* La confirmation de l'espèce *Escherichia coli* et l'identification de l'espèce *Proteus mirabilis* seront réalisées par la recherche d'indole (test complémentaire), positive dans le premier cas et négative dans le deuxième cas.

permet l'ensemencement des urines au lit du malade. Toutefois, elle présente le désavantage de ne pas obtenir des colonies isolées pour des concentrations de 10^6 bactéries par millilitre et donc nécessite souvent le réensemencement en isolement de l'urine en cas d'infection.

Appareils et méthodes automatiques

Différents automates ont été mis au point pour détecter les bactériuries significatives. Ces automates permettent de cribler rapidement (<30 minutes) les urines et de déterminer les échantillons qui seront alors ensemencés. Différentes

technologies ont été développées. La microscopie à flux couplée, soit à un système d'analyse d'image (IRIS iQ200®), soit à un système de marquage fluorescent (Sysmex UF-100®), permet non seulement le compte des bactéries, mais aussi celui des leucocytes, des hématies et la détection de cristaux, de levures. La technologie de l'automate Cellenium-160US® repose sur l'utilisation d'une sonde fluorescente marquant l'ensemble des bactéries qui sont détectées et dénombrées par un microscope à fluorescence. Le Coral UTI Screen system® repose sur la quantification de l'ATP bactérien par fixation sur la luciférine et émission de lumière après action de la luciférase. Tous ces automates ont l'inconvénient d'être chers à l'achat et ne peuvent être utilisés que par les laboratoires traitant plusieurs centaines d'échantillons d'urines par jour. Les échantillons détectés positifs doivent être secondairement ensemencés.

Incubation des urocultures

La majorité des bactéries des infections urinaires poussent en 18 à 24 heures et, en dehors de contextes particuliers, il n'y a pas lieu de prolonger l'incubation. Dans certains cas (bactéries exigeantes, déficientes, ou culture négative), malgré la présence de bactéries à l'examen direct, il faut savoir modifier le milieu de culture (gélose au sang ou « chocolat ») et l'atmosphère (anaérobiose et CO_2), et prolonger l'incubation.

Interprétation des urocultures

Interprétation de la bactériurie quantitative sur échantillons obtenus par la technique du « milieu de jet »

Les critères de Kass [5] qui servent historiquement de référence pour l'interprétation de la bactériurie sont les suivants :

- bactériurie < 10^4/ml : bactériurie non significative (contaminants) ;
- bactériurie > 10^5/ml : bactériurie significative.

Il reste une zone d'incertitude entre 10^4 et < 10^5 UFC/ml. Ces critères ont été établis dans le cadre d'études réalisées chez des patientes présentant une pyélonéphrite ou une bactériurie asymptomatique. Toutefois, Stamm et al. ont montré, en réalisant une étude chez des femmes présentant une cystite, qu'une observance stricte des critères de Kass pouvait entraîner le rejet à tort de diagnostic d'ITU pour près de 50 % des cas [8]. Dans cette étude, le taux de bactériurie seuil permettant d'inclure 95 % des cystites était de 10^3 UFC/ml. En outre, de nombreux facteurs affectent le comptage des bactéries (infection débutante, mictions nombreuses et répétées, pH acide urinaire, urée augmentée, localisation prostatique, etc.). En conséquence, il est admis que, sous respect strict des conditions de prélèvement, de transport et d'analyse des urines, toute bactériurie > 10^3 UFC/ml est à prendre en considération [3]. Le bactériologiste devra tenir compte, pour l'interprétation et la poursuite de l'analyse, de l'aspect monomicrobien ou polymicrobien de la culture, de la leucocyturie, du contexte clinique et des ECBU faits antérieurement ainsi que du type de micro-organisme retrouvé. Un groupe de microbiologistes européens a proposé un classement en catégories des germes retrouvés en culture dans les ECBU en fonction de leur niveau d'implication dans l'étiologie des infections urinaires [4] :

- un premier groupe qui peut être considéré comme pathogène lorsque les germes sont isolés, même en petites quantités, (10^3 UFC/ml) : *Escherichia coli* et *Staphylococcus saprophyticus* ;
- un deuxième groupe, plus habituellement impliqué dans le cadre des infections urinaires nosocomiales, lorsqu'il existe des facteurs anatomiques ou iatrogènes favorisants, et pour lequel un taux de 10^4 UFC/ml peut être proposé pour la femme (ce taux est abaissé à 10^3 UFC/ml chez l'homme pour prendre en compte le cas de la prostatite) : tribu *Proteae*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp. et *Staphylococcus aureus* ;
- un troisième groupe, dont l'implication comme pathogène exige un niveau de bactériurie > 10^5 UFC/ml. Ce groupe comprend des espèces à Gram positif (*Streptococcus agalactiae*, les staphylocoques à coagulase négative autres que *Staphylococcus saprophyticus*), à Gram négatif (*Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, autres *Pseudomonaceae*) ou les *Candida* spp. ;
- un quatrième groupe qui comprend les espèces considérées comme contaminantes qui appartiennent habituellement à la flore urétrale ou génitale de proximité : lactobacilles, streptocoques alpha-hémolytiques, *Gardnerella vaginalis*, *Bifidobacterium* spp., bacilles diphtérimorphes (sauf *Corynebacterium urealyticum*). Seul leur isolement à partir d'une ponction sus-pubienne peut permettre d'évoquer leur rôle pathogène.

L'ensemble de ces critères d'interprétation est réuni dans le tableau 16.3.

Notons que si une culture polymicrobienne est en faveur d'une contamination de l'urine, les infections urinaires à deux germes, bien que rares, existent. Donc, toute culture polymicrobienne ne doit pas conduire systématiquement à l'absence de poursuite du prélèvement.

Interprétation de la bactériurie quantitative sur échantillons obtenus par une technique différente de celle du « milieu de jet »

Les taux de bactériurie significatifs varient selon le mode de prélèvement et sont indiqués dans le tableau 16.3. Il est à noter que pour la ponction sus-pubienne, le taux est de 10 UFC/ml et nécessite donc l'ensemencement d'un volume minimum de 100 µl.

Cas particulier de la bactériurie asymptomatique

La bactériurie asymptomatique, dénommée aussi colonisation urinaire, se définit comme la présence de bactérie dans l'urine à un taux significatif (Tableau 16.3) en dehors de tout signe d'infection urinaire. La bactériurie asymptomatique peut survenir avec ou sans leucocyturie. La fréquence de la bactériurie chez la femme jeune est inférieure à 1 %, mais des fréquences

Tableau 16.3 **Taux de bactériurie pouvant justifier l'identification et l'antibiogramme du germe isolé en fonction du patient, des germes et du nombre d'espèces, d'après [4].**

Mode de prélèvement	Patient	Type de germes*	Nombre d'espèces isolées	Taux de bactériurie significative (UFC/ml)
« Milieu de jet »	Symptomatique	Groupe 1	1 ou 2	10^3
		Groupe 2	1	Femme : 10^4 Homme : 10^3
		Groupe 3	1	10^5
	Asymptomatique	Groupes 1–3	1	10^5
Sondage simple	Symptomatique Asymptomatique	Groupes 1–3	1 ou 2	10^3
Ponction sus-pubienne	Symptomatique Asymptomatique	Groupes 1–4	1 ou 2	10^1
Sur sonde à demeure	Symptomatique	Groupes 1–3	1 ou 2	10^4

* Les groupes 1 à 4 sont définis dans le texte.

de plus de 10 % peuvent être observées chez les patients de plus de 80 ans, les diabétiques, les patients ayant une vessie neurologique, les hémodialysés, et les patients sondés de façon intermittente ou à demeure. Toutefois, la recherche de bactériurie asymptomatique systématique n'est reconnue comme apportant un bénéfice réel que dans deux contextes cliniques particuliers. Au cours de la grossesse, la bactériurie asymptomatique ou colonisation urinaire gravidique représente un risque accru de survenue de pyélonéphrite et d'accouchement prématuré, et doit être systématiquement recherchée une fois par mois après le premier trimestre par bandelette urinaire (ou par ECBU d'emblée en cas de facteurs de risque associés : diabète, anomalie du tractus urinaire, antécédent de cystite récidivante). En prévision d'une intervention sur les voies urinaires et notamment d'une résection transurétrale de la prostate ou de l'ablation d'une sonde JJ, une bactériurie asymptomatique sera systématiquement recherchée et traitée afin de prévenir un risque accru de sepsis [3, 7].

Interprétations des discordances entre leucocyturie et bactériurie

Dans un certain nombre de cas, le microbiologiste et le clinicien peuvent être confrontés à une discordance entre la leucocyturie et la bactériurie. Les principales situations cliniques pour lesquelles une telle discordance peut survenir sont citées dans le tableau 16.4.

Tableau 16.4 **Contextes cliniques au cours desquels sont observées des discordances entre leucocyturie et bactériurie.**

Leucocyturie sans bactériurie		Bactériurie sans leucocyturie
Causes néphrologiques	Néphrites tubulo-interstitielles (lupus, maladie de Kawazaki, etc.)	Patient neutropénique
Causes infectieuses	MST : uréthrites à gonocoque, *C. trachomatis*, anaérobies Vaginite, leucorrhée Tuberculose rénale Infection urinaire décapitée	Jeune nourrisson Début d'infection
Inflammation de l'arbre urinaire	Calculs Radiothérapie Sondage	

Antibiogramme

L'antibiogramme est effectué en testant les antibiotiques qui ont une bonne élimination urinaire, en particulier : bêta-lactamines, quinolones et fluoroquinolones, cotrimoxazole, aminosides, fosfomycine.

Après obtention de l'identification

Les résultats définitifs devront être accompagnés de commentaires. Clairement rédigés, ils devront dans certains cas susciter le dialogue avec le clinicien. Certaines remarques sont fréquentes :

- concernant le mode de prélèvement, en cas de souillure, il faut rappeler les règles strictes du prélèvement ;
- l'ECBU est un des rares examens bactériologiques répétitifs ; en cas d'interprétation litigieuse, il convient de demander un nouvel ECBU ;
- des bactéries telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia* signent une ITU iatrogène ;
- parfois, l'antibiogramme n'est fourni qu'à titre indicatif ; il faut alors souligner que ce n'est pas une incitation à l'antibiothérapie.

Surveillance de l'ITU par le laboratoire

Au cours du traitement, si l'infection est liée à une bactérie usuelle sans mécanisme de résistance particulier, il n'y a pas lieu de redemander un ECBU après 48 heures de traitement ni au-delà, sauf en cas d'évolution défavorable (reprise de la fièvre, douleurs, etc.). La stérilisation des urines est rapide (< 48 heures). Le retour à la normale de la leucocyturie est plus lent et peut nécessiter 5 à 7 jours. En cas d'infection avec un germe inhabituel ou multirésistant, un ECBU de contrôle à 48 heures et après l'arrêt du traitement pourra être prescrit.

Contextes particuliers

Tuberculose

Toute leucocyturie sans bactériurie doit faire évoquer une tuberculose rénale. En fonction du contexte, une recherche de mycobactérie sera réalisée sur urines préalablement décontaminées 3 jours de suite (voir le chapitre 34, « Mycobactéries »).

Patients immunodéprimés et/ou âgés

La survenue d'une cystite hémorragique chez un patient immunodéprimé, un patient âgé ou un patient ayant subi une intervention urologique doit faire évoquer une infection à *Corynebacterium urealyticum* responsable de cystites dite « incrustantes ». Cette suspicion pourra être confortée par la présence de cristaux de type phosphate ammoniaco-magnésiens ou un pH urinaire alcalin. Les urines devront être ensemencées sur gélose au sang et l'incubation sera prolongée au moins de 48 heures. Cette corynébactérie a de plus la particularité d'être multirésistante.

Actinobaculum schaalii est une espèce récemment décrite proche des *Actinomyces* qui a été incriminée dans les infections urinaires chez le patient âgé avec des facteurs urologiques prédisposants (hypertrophie prostatique, cancer). Ce bacille à Gram positif, oxydase négative, catalase négative, est de croissance lente (> 3 jours) sur gélose enrichie et sous atmosphère anaérobie ou enrichie en CO_2. Son identification reste délicate par les méthodes traditionnelles, mais elle est parfaite en spectrométrie de masse.

Aerococcus urinae est une autre espèce récemment identifiée comme responsable d'infection urinaire chez le sujet âgé en particulier masculin avec des facteurs urologiques prédisposants. Ce cocci à Gram positif en tétrades ou diplocoques a les mêmes exigences de culture qu'*A. schaalii.* Les colonies catalase négative, présentent une alpha-hémolyse sur gélose au sang et ne sont correctement identifiées que par spectrométrie de masse.

Les levures poussent habituellement bien sur les milieux chromogènes en 24 heures. Toutefois, un milieu type Sabouraud ou chromogène pour levure sera ensemencé en présence de levures à l'examen direct, et en cas de suspicion clinique d'infection urinaire avec urine stérile.

Prostatite

Les prélèvements selon la méthode de Meares et Stamey en recueillant trois échantillons d'urines avant et après massage prostatique [6] sont maintenant abandonnés, notamment en raison de la douleur qu'ils provoquent et du risque de dissémination bactérienne. Le diagnostic sera réalisé sur un simple ECBU avec les critères cités plus haut. Rappelons que la bandelette urinaire dans le cadre des UTI masculines n'a d'intérêt que par sa valeur prédictive positive. Une bandelette négative n'élimine en rien le diagnostic.

Références

[1] American Academy of Pediatrics. Practice parameter : the diagnosis, treatment, and evaluation of the initial urinary tract infection in febrile infants and young children. American Academy of Pediatrics. Committee on Quality Improvement. Subcommittee on Urinary Tract Infection. Pediatrics 1999 ; 103 : 843–52.

[2] Bouza E, San Juan R, Munoz P, et al. An European perspective on nosocomial urinary tract infections I. Report on the microbiology workload, etiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-003 study). European Study Group on Nosocomial Infections. Clin Microbiol Infect 2001 ; 7 : 523–31.

[3] Conférence de consensus co-organisée par la Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF) et l'Association française d'urologie (AFU). Infections urinaires nosocomiales de l'adulte. Med Mal Inf 2002 ; 33 : 193–215.

[4] European Confederation of Laboratory Medicine. European urinalysis guidelines. Scand J Clin Lab Invest 2000 ; 231 : 1–86.

[5] Kass EH. Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract ; with observations on the use of methionine as a urinary antiseptic. AMA Arch Intern Med 1957 ; 100 : 709–14.

[6] Meares EM, Stamey TA. Bacteriologic localization patterns in bacterial prostatitis and urethritis. Invest Urol 1968 ; 5 : 492–518.

[7] Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, et al. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. Clin Infect Dis 2005 ; 40 : 643–54.

[8] Stamm WE, Counts GW, Running KR, et al. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. N Engl J Med 1982 ; 307 : 463–8.

[9] Wilson ML, Gaido L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. Clin Infect Dis 2004 ; 38 : 1150–8.

Diagnostic bactériologique des infections ORL et pulmonaires

F. Denis, C. Martin et al.

PLAN DU CHAPITRE

17.1 Généralités

F. Denis

Sur le plan anatomique, on distingue les infections de la sphère ORL, regroupant les atteintes des voies aériennes supérieures, c'est-à-dire le nez, la gorge et les oreilles. L'oropharynx est colonisé par de nombreuses et diverses populations commensales voisines de celles de la bouche et du nez.

Sous le terme d'infections respiratoires, on distingue toujours sur le plan anatomique d'une part les infections des voies aériennes supérieures septiques et d'autre part les voies aériennes inférieures sous-glottiques normalement stériles.

Les prélèvements portant sur des régions où les colonisations par des bactéries sont normales devront faire l'objet d'une attention toute particulière dans le recueil, le traitement des échantillons et bien sûr quant à l'interprétation des résultats qui se fera dans le cadre d'une nécessaire confrontation avec les autres examens biologiques et avec les éléments cliniques.

Vu les différences anatomiques, physiopathologiques et bactériologiques, les prélèvements de la sphère oropharyngée et trachéobronchiques sont traités séparément.

17.2 Prélèvements de la sphère oropharyngée

C. Martin

Introduction

Les infections de la sphère oropharyngée regroupent les atteintes des voies aériennes supérieures : nez, sinus, gorge et oreilles. La majorité des infections sont d'origine virale, ne nécessitant pas de prélèvement à visée diagnostique, leur traitement étant symptomatique. Dans ce chapitre, seul le diagnostic microbiologique des infections bactériennes de la sphère ORL sera détaillé.

Prélèvements pharyngés

L'angine est une infection douloureuse et fébrile des amygdales voire de l'ensemble du pharynx. Cette atteinte peut être isolée ou associée (grippe, rougeole, oreillons, mononucléose infectieuse, scarlatine, rhumatisme articulaire aigu, etc.).

Trois types d'angine bactérienne peuvent être individualisés :

- l'angine érythémateuse ou érythématopultacée à streptocoques β-hémolytiques (le plus souvent du groupe A) ;
- l'angine pseudomembraneuse à *Corynebacterium diphtheriae* ou à *Corynebacterium ulcerans* ;
- l'association fusospirillaire responsable de l'angine ulcéronécrotique de Vincent.

Streptococcus pyogenes (streptocoque du groupe A) est le premier agent responsable d'angines bactériennes : 30 à 40 % chez l'enfant et 10 à 25 % chez l'adulte. D'autres groupes de streptocoques peuvent être impliqués (C, G). Un test de diagnostic rapide (TDR) limité à la recherche de streptocoques du groupe A est recommandé devant une angine érythémateuse ou érythématopultacée. Ce TDR a une bonne spécificité (95 %) associé à une sensibilité de 90 %. La culture à partir d'un prélèvement pharyngé est limitée dans cette indication, le plus souvent dans les situations à risque de complication (rhumatisme articulaire aigu, glomérulonéphrite).

Mis à part les recherches effectuées dans le cadre des angines, certaines recherches peuvent être prescrites dans le bilan d'une infection sexuellement transmise (IST) (recherche de gonocoque) ou dans un dépistage de colonisation chez des patients ayant une hémopathie ou greffés (*Pseudomonas* spp., entérobactéries).

En revanche, le prélèvement de gorge est inutile voire à proscrire dans certaines des situations suivantes : portage du méningocoque (inutile et invasif), diagnostic des épiglottites à *Haemophilus influenzae* (risque de spasme), recherche au microscope à fond noir de *Treponema pallidum* dans des ulcérations (présence de tréponèmes commensaux) et en présence d'un phlegmon (la ponction est suffisante).

Prélèvements

Le prélèvement de gorge doit être réalisé avant antibiothérapie en évitant les contaminations salivaires à l'aide d'un abaisse-langue pour bien visualiser l'oropharynx et les amygdales qui sont écouvillonnés. L'écouvillon est ensuite placé dans un tube contenant un milieu de transport. En présence de dépôts, de zones érythémateuses, d'une ulcération ou de fausses membranes, le prélèvement doit se faire à ce niveau.

En présence d'un phlegmon, celui-ci doit être ponctionné et le pus obtenu traité comme une suppuration profonde. L'association d'un prélèvement de gorge ne présente pas d'intérêt.

Traitement des prélèvements au laboratoire

Les prélèvements pharyngés sont ensemencés sur différents milieux en fonction des recherches demandées et des situations cliniques.

Recherche de streptocoques

Une gélose Columbia au sang sélective (acide nalidixique ou colistine-aztréonam) pour bactérie à Gram positif est incubée à 37 °C en présence de 5 à 10 % de CO_2 ou en anaérobiose 48 heures (la β-hémolyse est mieux détectée). Un groupage de Lancefield (A, B, C, etc.) est réalisé sur les colonies β-hémolytiques (Fig. 17.1).

Autres bactéries

Les recherches spécifiques sont réalisées en fonction de l'aspect macroscopique des lésions et de la situation clinique. Les milieux ensemencés seront adaptés à la bactérie recherchée.

- L'examen microscopique doit être systématiquement pratiqué. Il est parfois évocateur de l'association fusospirillaire. Ainsi, l'observation de bactéries fusiformes et spiralées en abondance permet d'évoquer une angine ulcéronécrotique ou angine de Vincent (Fig. 17.2).
- L'isolement de *Neisseria gonorrhoeae* nécessite d'ensemencer à partir du milieu de transport, une gélose au sang cuit enrichie en mélange polyvitaminé et une gélose au sang cuit enrichie en mélange polyvitaminé et rendue sélective par un mélange inhibiteur (VCAT).

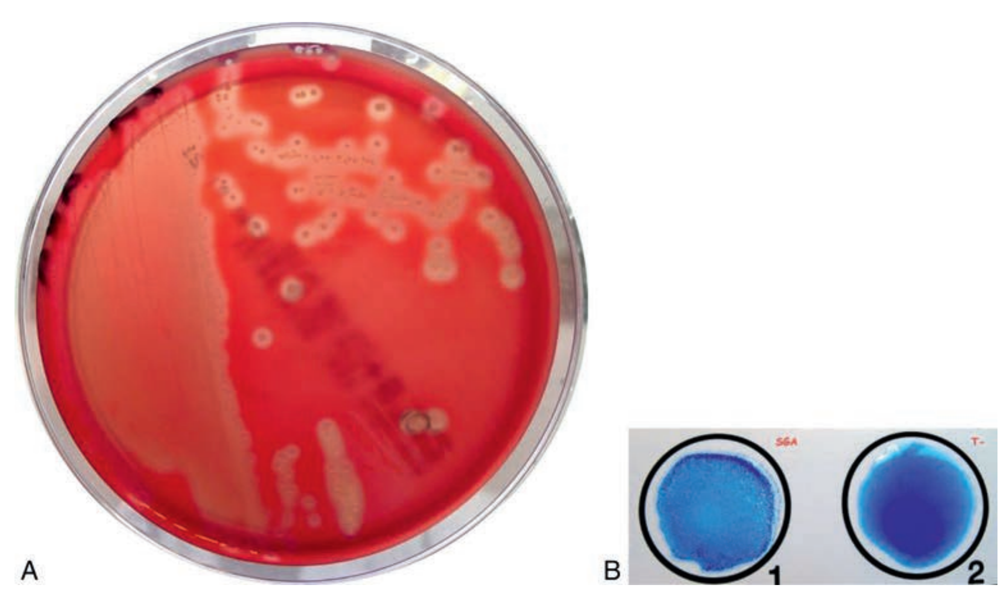


Fig. 17.1 A. Colonies β-hémolytiques de streptocoques du groupe A. B. Sérogroupage après extraction enzymatique du polyoside C de spécificité A (1) et témoin négatif (2).

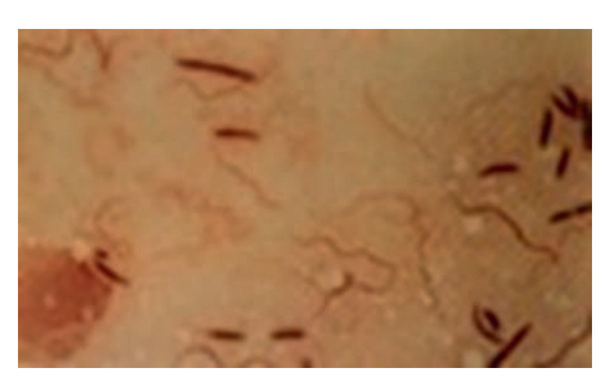


Fig. 17.2 Examen microscopique d'un prélèvement de gorge montrant une association fusospirillaire.

- À partir d'un écouvillonnage de la périphérie ou sous les pseudomembranes, *Corynebacterium diphtheriae* ou *Corynebacterium ulcerans* est isolé sur milieu de Loeffler ou milieu sélectif de Tinsdale (tellurite). Les colonies de *C. diphtheriae* sont noires entourées d'un halo brun (production H_2S). Une gélose Columbia au sang sélective (acide nalidixique ou colistine-aztréonam) pour bactérie à Gram positif et incubée à 37 °C en présence de CO_2 à 5–10 % peut également être utilisée. L'incubation des milieux doit être prolongée 5 jours (voir chapitre 32.1, « *Corynebacterium* et germes apparentés »).
- *Arcanobacterium haemolyticum* est isolé à partir d'une gélose Columbia au sang sélective (acide nalidixique ou colistine-aztréonam) pour bactérie à Gram positif. Elle est incubée à 37 °C en présence de 5 à 10 % de CO_2 pendant 48 à 72 heures pour observer une β-hémolyse intense et une morphologie analogue à celle des colonies de streptocoques (petites colonies blanches de 0,5 mm de diamètre).

Les bactéries les plus fréquemment isolées d'un pus de phlegmon des amygdales sont *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *S. aureus* et les anaérobies. L'utilisation de géloses sélectives (gélose Schaedler, *Brucella*) incubées en anaérobiose et de milieux liquides favorisant la croissance des anaérobies permet plus aisément leur isolement.

Prélèvements auriculaires

Les contextes cliniques conduisant à un prélèvement auriculaire sont l'otite moyenne aiguë (OMA) de l'enfant et de l'adulte, l'otite chronique de l'adulte et l'otite externe.

L'OMA purulente correspond à la surinfection bactérienne de l'oreille moyenne avec épanchement purulent ou mucopurulent dans la caisse du tympan. La paracentèse est indiquée systématiquement chez le nourrisson de moins de 3 mois, en cas de persistance de fièvre élevée et de douleurs intenses et en cas d'échec de l'antibiothérapie. Les bactéries isolées sont, chez l'enfant de plus 3 mois et l'adulte : *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catharralis*, *S. aureus*, *Alloiococcus otitidis* et *Turicella otitidis*. Chez le nourrisson de moins 3 mois, en plus des espèces citées précédemment, sont isolés *Pseudomonas aeruginosa* et des entérobactéries (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*). *H. influenzae* est souvent à l'origine de l'association conjonctivite–otite.

Les otites moyennes chroniques ou récidivantes de l'adulte nécessitent un examen cytobactériologique. Les bactéries isolées sont *P. aeruginosa*, les entérobactéries, les anaérobies, *Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus*. *Brevibacterium otitidis, Corynebacterium auris* et *Alloiococcus otitidis* sont de pathogénicité controversée.

Les otites externes sont dues à *Pseudomonas aeruginosa* (peut présenter des critères de gravité chez les sujets immunodéprimés). Les levures (*Candida*), les champignons (*Aspergillus*), les entérobactéries, les anaérobies, *Streptococcus pyogenes* et *Staphylococcus aureus* sont les agents pathogènes isolés des infections du conduit externe.

Prélèvements

Dans le cadre des OMA, le médecin ou le chirurgien, après nettoyage du conduit auditif externe, réalise une incision du tympan sous spéculum (paracentèse) afin de pratiquer une ponction pour l'étude cytobactériologique à l'aide d'un cathlon monté sur une seringue ou d'écouvillon fin en alginate ou Dacron® puis placé dans un milieu de transport.

Lors des OMA après une rupture spontanée de la membrane tympanique et dans les otites moyennes chroniques, un prélèvement après désinfection du conduit auditif externe à l'aide d'écouvillon fin en alginate ou Dacron® puis placé dans un milieu de transport est effectué.

Dans le cadre des otites externes, avant de réaliser le prélèvement comme décrit ci-dessus, il est nécessaire d'éliminer les croûtes à l'aide d'un coton humide.

Traitement des prélèvements au laboratoire

L'examen d'un frottis après coloration de Gram permet de communiquer au clinicien une orientation sur un pus de paracentèse et d'ajouter un milieu de culture en cas d'observation de morphologie particulière.

Les prélèvements issus de paracentèse sont ensemencés sur une gélose au sang et une gélose au sang cuit additionné de supplément polyvitaminé en atmosphère CO_2 (5 à 10 %), et un milieu permettant la croissance des bacilles à Gram négatif (CLED, BCP, MacConkey, etc.). La gélose au sang peut être placée en anaérobiose. Les milieux sont examinés après 24 et 48 heures d'incubation. Les milieux ensemencés à partir des pus des otites chroniques ou externes sont les suivants : gélose au sang additionnée ou non d'un mélange sélectif (acide nalidixique ou colistine-aztréonam) pour bactérie à Gram positif incubée en atmosphère CO_2 (5 à 10 %), gélose permettant la croissance des bacilles à Gram négatif (CLED, BCP, MacConkey, etc.), bouillon de type Schaedler, et gélose au sang en aérobiose incubée 5 jours.

Les problèmes d'interprétation peuvent survenir en cas de prélèvement de mauvaise qualité (otite chronique et otite moyenne). Il existe cependant des otites polymicrobiennes. *A. otitidis* et *T. otitidis* doivent être rapportés dans le cadre des OMA.

Prélèvements nasal et rhinopharyngé, pus de sinus

Le prélèvement des fosses nasales est effectué dans le cadre de la recherche de *S. aureus* ou de portage de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM). Le diagnostic de coqueluche

est effectué à partir d'une aspiration nasopharyngée (voir le chapitre 30.6).

La sinusite aiguë purulente correspond à une surinfection ORL virale par des bactéries et se manifeste par une rhinorrhée purulente (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catharralis*, *S. aureus*, *S. pyogenes* et anaérobies chez l'adulte). Elle peut être nosocomiale chez des patients intubés et ventilés ou porteurs d'une sonde nasogastrique et sont plus volontiers à *P. aeruginosa*, entérobactéries et *S. aureus*.

La sinusite chronique est une complication d'une sinusite aiguë. Souvent, les cultures sont polymicrobiennes (bacille à Gram négatif, à anaérobies ou à champignons). Le diagnostic étiologique des sinusites est difficile ; les prélèvements sont invasifs et l'interprétation des cultures est parfois complexe en raison de cultures polybactériennes contenant des bactéries en situation commensale ou pathogène comme *H. influenzae*, *S. aureus* ou *S. pneumoniae*. L'appréciation de la quantité de bactéries isolées et la confrontation avec le contexte clinique sont nécessaires.

Prélèvements

Le chirurgien effectue les prélèvements par aspiration ou ponction au niveau du méat moyen. Plus rarement, des biopsies de muqueuses ou osseuses sont réalisées sous contrôle visuel. Ces biopsies doivent être placées dans un récipient contenant une faible quantité de sérum physiologique en rapport avec le volume faible de ces biopsies. L'utilisation d'un milieu de transport doit être favorisée pour l'isolement des anaérobies et le transport à température ambiante doit être rapide.

Traitement des prélèvements au laboratoire

L'examen d'un frottis après coloration de Gram permet un diagnostic d'orientation. La mise en culture s'effectue sur différents milieux : gélose au sang, gélose au sang sélective (acide nalidixique ou colistine-aztréonam) pour bactérie à Gram positif (37 °C, CO_2 à 5 à 10 %) permettant la croissance des streptocoques et *S. aureus*, gélose au sang cuit additionné de facteurs de croissance ± sélective *Haemophilus* (37 °C, CO_2 à 5 à 10 %), gélose sélective à bacilles à Gram négatif (CLED, BCP, MacConkey, etc.), gélose au sang en anaérobiose. Parallèlement, la recherche de champignons (*Aspergillus*) doit être réalisée.

Conclusion

La plupart des prélèvements sont réalisés dans de bonnes conditions. Les recherches spécifiques doivent être mentionnées. Le diagnostic des sinusites chroniques est particulièrement difficile en raison du caractère souvent polymicrobien des cultures et de la difficulté de mettre en cause un agent.

Le tableau 17.1 rappelle le diagnostic des différentes infections ORL envisagées dans ce chapitre.

Tableau 17.1 **Diagnostic des infections ORL (circonstances, pathogènes, milieux de culture à ensemencer).**

Infections	Signes cliniques	Pathogènes recherchés	Milieux ensemencés	Remarques
Pharyngées	Angine aiguë	*Streptococcus pyogenes*, streptocoques des groupes C et G, *Arcanobacterium haemolyticum*	● □Ana/● □CO_2 + ● □CNA/CAP CO_2	Incubation prolongée pour *A. haemolyticum*
	Angine ulcéronécrotique	Microscopie après coloration de Gram	Pas de mise en culture	
	Angine fausses membranes	*Corynebacterium diphtheriae*, *C. ulcerans*	● □aéro + ● □CO_2 + ● □CNA/CAP CO_2	Incubation 5 jours
	IST	*Neisseria gonorrhoeae*	● □CO_2 + ● □VCAT-CO_2	Incubation 5 jours
	Portage chez patients immunodéprimés	*P. aeruginosa*, entérobactéries	● □CO_2 + ● □Aéro	
	Phlegmon amygdale	*S. pyogenes, Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus*, anaérobies	● □CNA/CAP CO_2 + ● □Ana + ● □Aéro + ● □BAT CO_2	Bouillon anaérobie
Auriculaires	Otite moyenne aiguë	*S. pyogenes, H. influenzae, Moraxella catarrhalis, S. aureus, Turicella otitidis, Alloiococcus otitidis, P. aeruginosa**, *S. pyogenes**, entérobactéries*	● □CO_2 + ● □CNA/CAP CO_2 + ● □Aéro + ● □CO_2	
	Otite moyenne chronique	*P. aeruginosa, S. aureus, C. auris, A. otitidis*, anaérobies	● □CO_2 + ● □CNA/CAP CO_2 + ● □Ana + ● □Aéro + ● □CO_2	Bouillon anaérobie
	Otite externe	*P. aeruginosa, S. aureus, S. pyogenes*, entérobactéries, anaérobies, champignons, levures	● □CO_2 + ● □CNA/CAP CO_2 + ● □Ana + ● □Aéro + ● □CO_2	Utilisation de milieux de mycologie

Nasopharynx Sinusites	Dépistage	*S. aureus*, SARM	●□CO_2 + ● Aéro	
	Coqueluche	*Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*	●□Aéro + ●□S Aéro	Détection par biologie moléculaire
	Sinusite aiguë	*S. pyogenes*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *S. aureus*; en plus chez les adultes *S. pyogenes*, anaérobies	●□CO_2 + ●□CNA/CAP CO_2 + ●□Ana + ●□Aéro + ●□CO_2	Bouillon anaérobie
	Sinusite chronique	*S. pyogenes*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa**, *S. pyogenes**, anaérobies, entérobactéries	●□CO_2 + ●□CNA/CAP CO_2 + ●□Ana + ●□Aéro + ●□CO_2	Bouillon anaérobie, utilisation de milieux de mycologie

* En plus chez les enfant de moins de 3 mois.
IST : infection sexuellement transmise.
●□Ana : gélose Columbia au sang incubée en anaérobiose
●□CO_2 : gélose Columbia au sang incubée en présence de de CO_2 5–10 %
●□CNA/CAP CO_2 : gélose Columbia au sang sélective pour isolement de bactérie à Gram positif (colistine-acide nalidixique/colistine-aztréonam) incubée en présence de CO_2 5–10 %
●□CO_2 : gélose au sang cuit incubée en présence de CO_2 5–10 %
●□VCAT CO_2 : gélose au sang cuit sélective ***Neisseria*** (vancomycine, colistine, amphotéricine B, triméthoprime) incubée en présence de CO_2 5–10 %
●□BVA CO_2 : gélose au sang cuit sélective ***Haemophilus*** (bacitracine, vancomycine, amphotéricine B) incubée en présence de CO_2 5–10 %
●□Aéro : gélose pour isolement des bacilles à Gram négatif (CLED, BCP, Drigalski, MacConkey) incubée en aérobiose
●□Aéro: gélose Loeffler incubée en aérobiose
●□Aéro : gélose chromogène ***S. aureus***/SARM
●□Aéro : gélose de Bordet-Gengou
●□S Aéro : gélose de Bordet-Gengou sélective (céphalexine)

Pour en savoir plus

Gwaltney Jr. JM. Sinusitis. In : Mandel G, Benett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed Churchill Livingston–Elsevier; 2005. p. 772–82.

Mariani-kurkdjian P, Bingen E. Prélèvements de la sphère oropharyngée? In : Denis F, Ploy MC, Martin C, et al., editors. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. 2e éd,. Prélèvements de la sphère oropharyngée? Paris : Elsevier Masson; 2011. p. 216–21.

Société Française de microbiologie. Infections ORL. In : REMIC, editors. Référentiel en microbiologie médicale. 2015. p. 235–46.

Tano K, von Essen R, Eriksson PO, et al. Alloiococcus otitidis – otitidis media pathogen or noral bacterial flora? APMIS 2008; 116 : 785–90.

Waites KB, Saubolle MA, Talkington DF, et al. Laboratory diagnosis of upper respiratory tract infectious. Washington DC : Cumitech; 2006. 10A.

17.3 Examens bactériologiques des sécrétions trachéobronchiques (hors mycobactéries)

C. Martin, F. Garnier, F. Denis

Introduction

Les infections respiratoires sont les infections les plus fréquentes et surviennent à tout âge avec cependant une fréquence accrue chez les enfants et les vieillards. Elles surviennent dans des contextes cliniques divers : immunodépression, terrain génétique (mucoviscidose), patient intubé-ventilé, mais aussi chez des sujets sans facteurs de risque particuliers.

Les micro-organismes responsables d'infections pulmonaires sont nombreux : virus (les plus fréquents), bactéries et plus rarement champignons. Les recherches de certains agents bactériens pathogènes (mycobactéries, *Chlamydophila pneumoniae*, mycoplasmes, légionelles, *Bordetella pertussis*) réalisées dans un contexte clinique particulier et nécessitant l'utilisation des techniques spécifiques ne seront pas traitées dans ce chapitre. L'examen des sécrétions bronchiques des patients atteints de mucoviscidose sera abordé à la fin de ce chapitre.

Rappels anatomocliniques

La stérilité des voies aériennes sous-glottiques (bronches et alvéoles) est le résultat d'une épuration bactérienne assurée par trois types de défense (Fig. 17.3) :

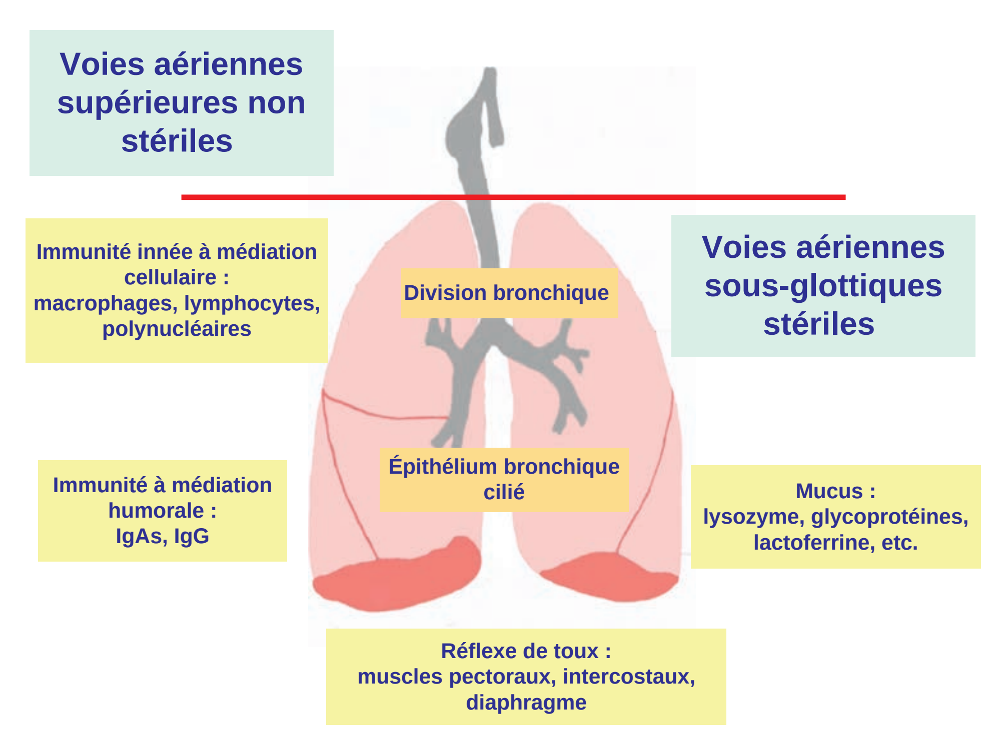


Fig. 17.3 Mécanismes concourant à la stérilité des voies respiratoires inférieures.

- mécanique (réflexe de toux, division bronchique, épithélium bronchique cilié, etc.) ;
- humorale (IgA, IgG, lysozyme, surfactant, antiprotéases) ;
- cellulaire (macrophages, lymphocytes, polynucléaires).

Pour une bonne interprétation des cultures, il est nécessaire de connaître la composition de la flore oropharyngée présente dans certains prélèvements (expectorations, aspirations bronchiques). La flore oropharyngée est constituée de streptocoques (*Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mitis*, etc.), de pneumocoques, de *Neisseria*, de *Moraxella*, d'*Haemophilus*, de corynébactéries et de staphylocoques. De nombreuses espèces anaérobies appartiennent également à la flore de colonisation. Toutes ces bactéries peuvent être la source de contamination de prélèvements d'origine pulmonaire, mais elles sont aussi à l'origine de surinfections bronchiques.

Pathogenèse

Sur le plan anatomique, la distinction des voies aériennes supérieures colonisées et des voies aériennes inférieures sous-glottiques normalement stériles est à prendre en considération, comme il est nécessaire de distinguer les infections du parenchyme pulmonaire de celles des voies respiratoires basses.

Les infections des voies respiratoires sont les bronchites (aiguës ou chroniques). Elles sont le plus souvent d'origine virale, surtout chez l'enfant. Le rôle de bactéries commensales des voies aériennes supérieures (*S. pneumoniae, H. influenzae* et *M. catharralis*) nécessite une confrontation avec les éléments cliniques. Chez les patients atteints de bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO), des bactéries résistantes (*S. aureus*, entérobactéries, *P. aeruginosa*) peuvent être sélectionnées au cours des antibiothérapies précédentes.

Les infections parenchymateuses sont les pneumonies ou pneumopathies et les abcès. La colonisation et l'infection bactérienne s'effectuent selon différents modes : après bactériémie (nécessité de prélever des hémocultures), par contiguïté (péricardique), par déglutition ou par inhalation, qui est le mode le plus fréquent. Un drainage insuffisant des voies respiratoires (bronchites, dilatation des bronches, sténose, atélectasie), une destruction de l'épithélium ou une altération des tissus (fibrose) induit une stase bactérienne qui permet l'installation du processus infectieux. Les bactéries les plus fréquemment responsables de pneumonies communautaires sont *S. pneumoniae,* les entérobactéries, *H. influenzae*, *Legionella pneumophila* et *B. catharralis*, mais aussi *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Coxiella burnetii.* Les bactéries responsables des pneumopathies nosocomiales sous ventilation mécanique sont *S. aureus*, *P. aeruginosa* et les entérobactéries ; le rôle des bactéries anaérobies a également été évoqué.

Diagnostic bactériologique direct

L'indication de prélever doit tenir compte de l'état du patient et de la nécessité de modifier son traitement et sa prise en charge. Le choix du prélèvement est fonction de l'importance clinique, du terrain du patient (immunodépression) et des recherches spécifiques (bactéries « atypiques », mycobactéries) (Tableau 17.2). La stratégie diagnostique d'une infection bronchopulmonaire va dépendre de sa gravité clinique. Les possibilités techniques ne sont pas les mêmes s'il s'agit de malades dits ambulatoires ou de malades hospitalisés dans des services de réanimation ou de soins intensifs intubés et ventilés mécaniquement ou trachéotomisés. Pour des cas simples chez des patients ayant un état général conservé, l'analyse bactériologique des expectorations convenable-

Tableau 17.2 **Bactéries à rechercher en fonction du contexte clinique et du prélèvement reçu au laboratoire.**

Bactérie	*Expectoration*	*Aspiration bronchique*	*LBA*	*Prélèvement protégé*	*Autres*
Staphylococcus aureus	●V ●B ●O ●G	●V ●B ●O	●V ●B ●O ●G	●V ●B ●O	Hémoculture
Streptococcus pneumoniae	●V ●B ●O ●G	●V ●B ●O	●V ●B ●O ●G	●V ●B ●O	Hémoculture, antigène soluble urinaire
Hæmophilus influenzae	●V ●B ●O ●G	●V ●B ●O	●V ●B ●O ●G	●V ●B ●O	
Moraxella catharralis	●V ●B ●O ●G	●V ●B ●O	●V ●B ●O ●G	●V ●B ●O	
Klebsiella pneumoniae	●V ●B ●O ●G	●V ●B ●O	●V ●B ●O ●G	●V ●B ●O	Hémoculture
Bacille à Gram négatif autres	○V ●B ●O ●G	○V ●B ●O	○V ●B ●O ●G	○V ●B ●O	
Pseudomonas aeruginosa	○V ●B ●O ●G	○V ●B ●O	○V ●B ●O ●G	○V ●B ●O	
Burkholderia cepacia	○V ●B ●G	○V ●B	○V ●B ●G	●B ○O	
Nocardia spp.	○V ○B ○O ○G	○V ○B ○O	○V ○B ○O	○V ○B ○O	
Mycobactéries	○V ○B ○O ○G	○V ○B ○O	○V ○B ○O	○V ○B ○O	
Legionella spp.	○V ○B ○O	○V ○B ○O	○V ○B ○O	○V ○B ○O	Antigène soluble urinaire, biologie moléculaire
Chamydophila pneumoniae	○V ●B ○O ○G	○V ○B ○O	○V ○B ○O	○V ○B ○O ○G	Biologie moléculaire
Mycoplasma pneumoniae	○V ●B ○O ○G	○V ○B ○O	○V ○B ○O ○G	○V ○B ○O ○G	Biologie moléculaire
Anaérobies	○O ○G	○V ○B ○O	○V ○B ○O ○G	○V ○B ○O ○G	

●V Pneumopathies communautaires (○V recherche en fonction des circonstances cliniques).
●B Pneumopathies nosocomiales ou immunodépression (○B recherche en fonction des circonstances cliniques).
●O Exacerbations bronchiques (○O recherche en fonction des circonstances cliniques).
●G Mucoviscidose (○G recherche en fonction des circonstances cliniques).

ment recueillies et lavées peut fournir des résultats acceptables, mais la contribution au diagnostic de ce prélèvement demeure en général faible. En revanche, si le processus infectieux présente un caractère vital, la réalisation d'un prélèvement fiable (aspiration endotrachéale [AET], mini-lavage bronchoalvéolaire [LBA], brossage distal protégé ou cathéter distal protégé) sera nécessaire. Il en est de même si une étiologie à bactérie anaérobie est suspectée.

Prélèvements respiratoires

La qualité du prélèvement conditionne la qualité de l'analyse et des résultats.

Expectoration

L'expectoration est le seul prélèvement respiratoire réalisé par le patient. Il doit être réalisé à jeun, après rinçage buccodentaire à l'eau distillée stérile, après un effort de toux ou après kinésithérapie.

Le prélèvement est recueilli dans un tube à fond conique. L'exsudat produit doit provenir d'une origine profonde et ne pas être un exsudat rhinopharyngé contaminé par la salive. Le malade doit être informé du but recherché. Malgré ces informations, le prélèvement qui parvient au laboratoire est souvent d'origine salivaire et impropre à une analyse correcte.

Fibroaspiration et aspiration endotrachéale (AET)

Ce prélèvement est réalisé lors d'une fibroscopie bronchique chez des patients atéléctasiques ou chez les malades intubés ou trachéotomisés à l'aveugle. Un système d'aspiration étanche (poche d'aspiration reliée par deux tuyaux au manomètre de dépression branché au vide mural) relié à la sonde d'aspiration stérile introduite dans la trachée permet le recueil des sécrétions qui, bien que contaminées par la flore oropharyngée, présenteront l'avantage d'avoir été recueillies au niveau même de la lésion ou à proximité. Si les sécrétions sont peu abondantes, l'opérateur pourra injecter et réaspirer 20 à 50 ml de sérum physiologique stérile, réalisant ainsi un mini-lavage.

Cathéter distal protégé

L'aspiration bronchique à l'aide d'un cathéter distal protégé est réservée aux malades intubés et ventilés à lésions bilatérales puisque l'introduction d'un double cathéter protégé est faite à l'aveugle. Après injection de 1 ml de sérum physiologique et réaspiration à la seringue, l'extrémité du cathéter est sectionnée aseptiquement comme une brosse et placée dans un tube stérile.

Brossage distal bronchique protégé

Cette technique associe les avantages de la fibroscopie (prélèvement dirigé au niveau du foyer infectieux) et de l'aspiration trachéale (absence de contamination par la flore pharyngée du fait de la protection de la brosse par un double cathéter obturé d'un bouchon de polyéthylène glycol [PEG] amovible terminal qui est introduit par le canal du fibroscope). Le fibroscope est dirigé vers la zone à étudier. Le double cathéter est ensuite introduit dans le fibroscope. Après brossage, l'extrémité de la brosse est sectionnée stérilement, puis placée dans un tube contenant 1 ml de sérum physiologique stérile.

Liquide bronchoalvéolaire (LBA) et mini-LBA

Sa réalisation consiste à instiller du sérum physiologique au travers du canal interne du fibroscope, lequel est positionné dans une bronche de 3e ou 4e génération. Le contenu des bronchioles distales et les alvéoles sont ainsi échantillonnés. Un volume total de 100 à 200 ml est administré par aliquotes successives de 50 ml. La première aliquote n'est pas utilisée pour l'analyse microbiologique.

Le mini-LBA est réalisé à l'aveugle, un volume restreint à 20 ml de sérum physiologique étant instillé au moyen d'un double cathéter stérile et obturé. Il est positionné à l'aveugle dans l'arbre trachéobronchique. Le bouchon de polyéthylène glycol est expulsé à l'aide d'une seringue de 10 ml remplie d'air (Combicath®, Plastimed). Après instillation, 3 à 5 ml sont recueillis par aspiration.

Le LBA est plus particulièrement destiné à la recherche de virus (cytomégalovirus [CMV]), de champignons (*Pneumocystis jirovecii*), de levures et de certaines bactéries (légionelles, *Nocardia*, *Actinomyces*).

Autres prélèvements

Le tubage gastrique essentiellement réservé à la recherche de mycobactéries est pratiqué à jeun et recueille les sécrétions pulmonaires dégluties au cours de la nuit. Les biopsies pulmonaires permettent en plus une étude immunologique et histologique parallèlement à la recherche bactériologique. Les aspirations nasopharyngées sont réalisées dans le cadre du diagnostic de chlamydiose et surtout de coqueluche.

Les hémocultures sont indispensables dans les atteintes parenchymateuses graves communautaires (isolement fréquent d'un pneumocoque) et chez les patients immunodéprimés (*S. aureus*, entérobactéries, *P. aeruginosa*). Une ponction du liquide pleural est réalisée en cas d'empyème (infection d'origine) pulmonaire.

Chez l'adulte, la détection d'antigènes solubles de pneumocoque ou de *Legionella pneumophila* (sérotype 1) dans les urines permet un diagnostic plus précoce de ces infections. La détection d'antigène soluble pneumococcique dans le liquide pleural possède une bonne spécificité. Chez l'enfant, la colonisation par le pneumocoque peut entraîner une « fausse » positivité du test liée au portage ; cette recherche n'est donc pas recommandée avant l'âge de 12 ans.

Transport et stockage

La flore commensale d'accompagnement des expectorations et des aspirations non protégées va se multiplier rapidement et fausser les résultats de l'analyse semi-quantitative. De plus, certains agents infectieux comme le pneumocoque ou *B. pertussis* sont fragiles et nécessitent un transport rapide (moins de 2 heures).

Le prélèvement est recueilli dans un récipient stérile : pot, tube à fond conique. En ce qui concerne les brosses, celles-ci sont mises dans un tube contenant 1 ml de sérum physiologique.

Éléments non bactériologiques du diagnostic

L'examen cytologique des expectorations est important pour valider le caractère profond du prélèvement et ainsi permettre d'éliminer ceux dont l'origine salivaire est certaine. Les critères retenus sont détaillés dans le tableau 17.3.

Traitement des prélèvements au laboratoire

Les différentes étapes de traitement des échantillons au laboratoire sont résumées à la figure 17.4.

Expectorations, fibroaspiration et aspiration endotrachéale

Les aspirations bronchiques seront traitées d'une manière analogue aux expectorations. Si l'aspiration est trop diluée, une centrifugation est réalisée. L'examen microscopique (Fig. 17.5) et l'ensemencement seront effectués sur le culot.

L'aspect (hémorragique, purulent, etc.) est noté. L'examen microscopique après coloration de Gram (grossissement ×100) est effectué sur la fraction la plus purulente du produit. Le nombre de leucocytes/champ et le nombre de cellules épithéliales/champ est déterminé et permet de ne pas poursuivre l'analyse bactériologique pour les prélèvements de classes 1, 2 et 3 (voir Tableau 17.3). La présence de bactéries (abondance, morphologie, aspect monomicrobien ou polymicrobien) est également précisée.

À quantité égale, sécrétions et fluidifiant (solution à 10 % de Digesteur®, Eurobio) sont mélangés et homogénéisés pendant 2 minutes sur Vortex® puis laissés 15 minutes à la température du laboratoire. Deux dilutions à 10^{-2} et 10^{-4} (2 dilutions successives de 0,1 ml dans 10 ml d'eau distillée) sont ensemencées à l'aide d'une anse calibrée de 10 µl pour les expectorations. Pour les fibroaspirations, une dilution

Tableau 17.3 **Critères de sélection des expectorations pour la poursuite de l'étude bactériologique.**

Classe selon Bartlett-Murray et Washington	Cellules épithéliales/champ	Leucocytes/champ	Qualification
1	>25	<10	Refusé
2	>25	10–25	Refusé
3	>25	>25	Refusé
4	10–25	>25	Accepté
5	<10	10–25	Accepté

Moyenne sur 10 champs (oculaire 10/objectif 10).

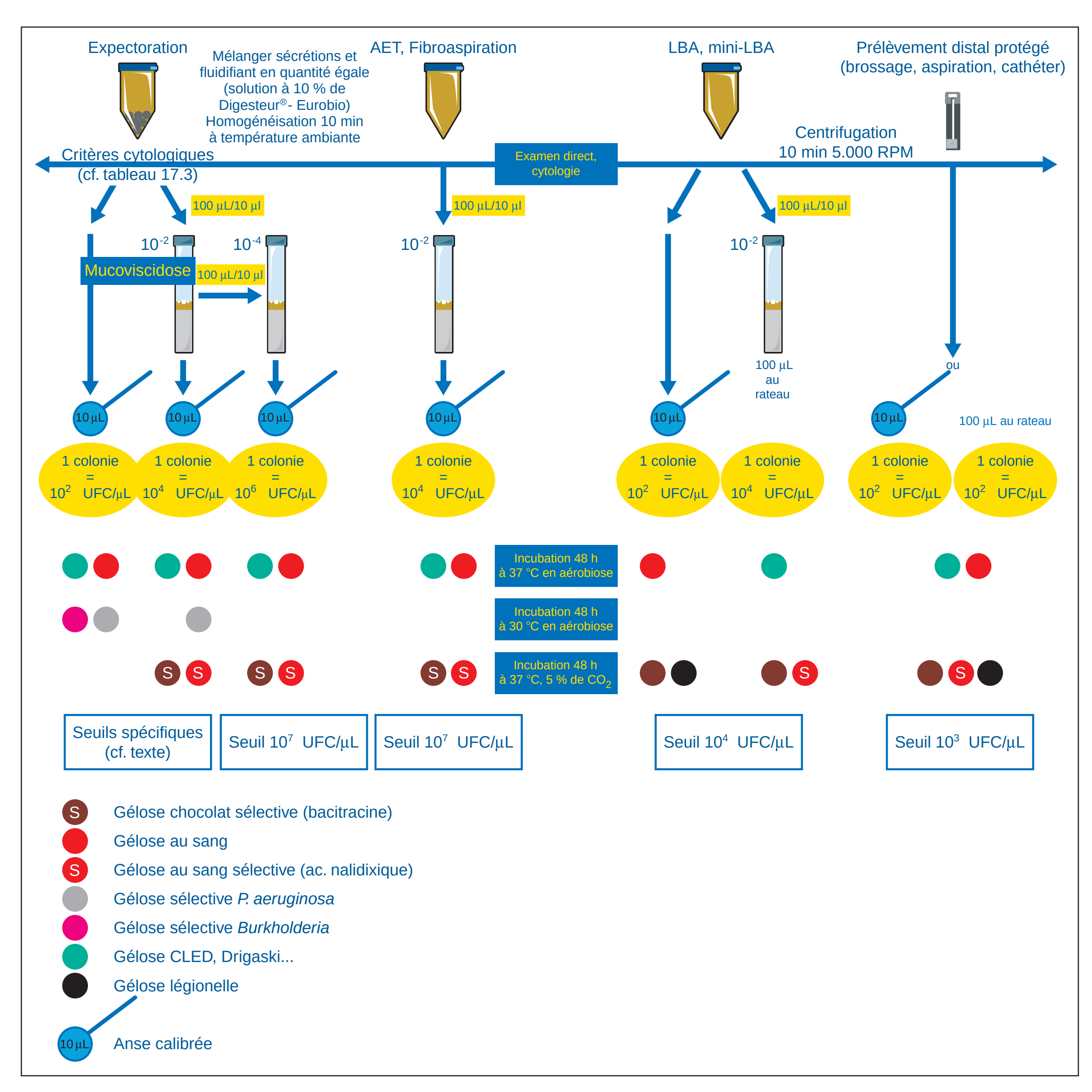


Fig. 17.4 Représentation synoptique des étapes de l'étude bactériologique des différents prélèvements des sécrétions bronchiques.

à 10^{-2} en eau distillée (0,1 ml dans 10 ml) est ensemencée à l'aide d'une anse calibrée de 10 µl. Les milieux utilisés sont une gélose au sang en aérobiose, un milieu permettant la croissance des bacilles à Gram négatif (CLED, BCP, MacConkey, etc.) et une gélose au sang cuit additionné de supplément polyvitaminé (CO_2) ± bacitracine. Les milieux sont examinés après 24 et 48 heures d'incubation. Le seuil de significativité est de 10^7 UFC/ml pour les expectorations et de 10^4 UFC/ml pour les aspirations bronchiques.

Liquide bronchoalvéolaire (LBA) et mini-LBA

Après homogénéisation, le LBA est ensemencé avec une anse calibrée de 10 µl sur une gélose au sang, une gélose au sang cuit additionné de supplément polyvitaminé (CO_2). À partir d'une dilution au 1/100e, sont ensemencés un milieu pour bacille à Gram négatif (CLED, BCP, MacConkey, etc.), une gélose au sang sélective pour bactéries à Gram positif. Les milieux sont examinés après 24 et 48 heures d'incubation. Une colonie représente 10^2 UFC/ml et 10^4 UFC/ml (dilution à 10^{-2}). Le seuil est de 10^4 UFC/ml pour ces prélèvements. Secondairement, un examen microscopique après cytocentrifugation (1500 rpm, 15 minutes) après coloration de Gram et de MGG est réalisé. La présence de cellules épithéliales signe une contamination salivaire.

Cathéter distal protégé et brossage distal protégé

Les brossages bronchiques protégés distaux et les aspirations bronchiques distales protégées sont ensemencés selon une méthodologie commune. Après homogénéisation (Vortex®), l'ensemencement est réalisé avec une anse calibrée de 10 µl sur une gélose au sang, un milieu pour

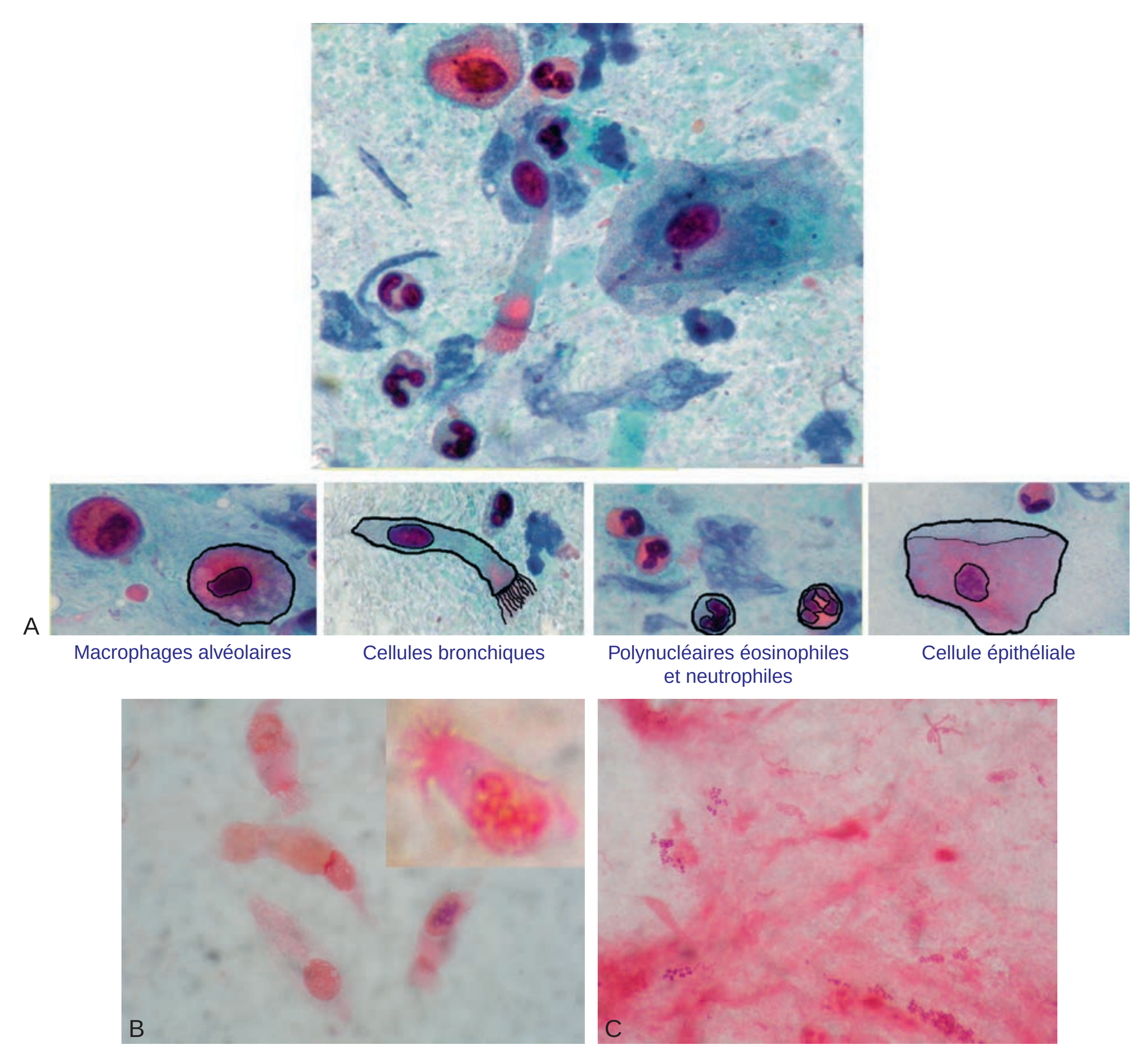


Fig. 17.5 Examen cytobactériologique d'une aspiration bronchique. A. Coloration de Papanicolaou. **B.** Coloration de Gram : cellules bronchiques. **C.** Coloration de Gram : contamination par une flore oropharyngée.

bacilles à Gram négatif (CLED, BCP, MacConkey, etc.), une gélose au sang cuit de supplément polyvitaminé (CO_2). Un bouillon de type Schaedler pour la recherche d'anaérobies et des milieux adaptés en fonction des recherches spécifiques (légionelles, mycoplasmes ou autres) seront également mis en œuvre selon les indications de la prescription médicale ou en fonction des renseignements cliniques. Les milieux sont examinés après 24 et 48 heures d'incubation. Le seuil est de 10 colonies ($\geq 10^3$ UFC/ml). Un examen microscopique (Gram) est réalisé sur un culot de centrifugation d'une fraction du prélèvement.

Interprétation

La qualité du prélèvement est primordiale et doit être évaluée et signalée au service clinique pour les prélèvements non protégés. La numération semi-quantitative et la détermination de seuil permettent l'interprétation des résultats, mais l'implication dans la symptomatologie de bactéries pouvant être en situation commensale ou pathogène comme *H. influenzae*, *S. aureus* ou *S. pneumoniae* est difficile à évaluer sans un dialogue avec le clinicien (Tableau 17.4).

Diagnostic bactériologique indirect

Il est parfois nécessaire de recourir à la sérologie (diagnostic indirect) pour le diagnostic des infections à mycoplasmes, à *Chlamydophyla*, à *Coxiella* et à *Legionella*. L'interprétation de ces sérologies figure dans les différents chapitres de bactériologie systématique. Les résultats des sérologies sont cependant rétrospectifs et ne constituent pas toujours une preuve diagnostique indiscutable.

Tableau 17.4 **Indications, principales modalités de prélèvements et caractéristiques techniques (seuil de détection, recherches spécifiques) des différentes méthodes d'explorations dans les infections bronchopulmonaires.**

Prélèvements*	Expectorations	Fibroaspiration	LBA	Mini-LBA	KTDP	BDP	
Terrain, indications	Pneumopathie communautaire, BPCO	Atélectasie	Soins intensifs, ID	Soins intensifs	Pneumopathie chronique nosocomiale	Pneumopathie chronique nosocomiale	Malade
Intubé-ventilé	–	±	+	+	+	±	
Nécessité d'un fibroscope	–	+	+	+	–	+	Prélèvement
Sérum physiologique injecté	–	±	3 × 50 ml	3 × 20 ml	1 ml	–	
Type récipient	Pilulier, tube à fond conique	Pilulier, tube à fond conique	Pilulier, tube à fond conique	Pilulier, tube à fond conique	Pilulier, tube à fond conique	Tube contenant 1 ml de sérum physiologique	
Transport	≤2 h	≤2 h	Immédiat	Immédiat	Immédiat	Immédiat	
Conservation	Température ambiante	Température ambiante	–	–	–	–	
Volume des sécrétions	1–10 ml	1–10 ml	150 ml	2–10 ml	500 µl	10 µl	
Contamination oropharynx	+	+	+	+	–	–	
Étude cytologique	Critères de Bartlett (voir tableau 17.3)	Critères de Bartlett (voir tableau 17.3)	+	+	+	+	Bactériologie
Seuil de positivité	$\geq 10^7$ UFC/ml	$\geq 10^6$ UFC/ml	$\geq 10^4$** UFC/ml	$\geq 10^3$ UFC/ml	$\geq 10^3$ UFC/ml	$\geq 10^3$ UFC/ml	
Recherches spécifiques	Mycobactéries, légionelles, *Nocardia*, mycoplasme, *Chlamydophila*	Mycobactéries, légionelles, *Nocardia*, mycoplasme, *Chlamydophila*	Parasites, champignons, levures, mycoplasme, *Chlamydophila*, légionelles	Parasites, champignons, levures, mycoplasme, *Chlamydophila*, légionelles	Parasites, champignons, levures, mycoplasme, *Chlamydophila*, légionelles	Parasites, légionelles	

* Sauf AET : aspiration endotrachéale.
** Sauf *Nocardia*, mycobactérie, légionelle, *Actinomyces*.
BDP : brossage distal protégé ; BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive ; KTDP : cathéter distal protégé ; LBA : liquide de lavage bronchoalvéolaire.

Cas particuliers de la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive qui porte sur le gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) codant une protéine impliquée dans les échanges ioniques des cellules épithéliales. Les conséquences de ces mutations sont une perturbation de ces échanges qui entraîne une déshydratation des sécrétions bronchiques et une augmentation de leur viscosité. Ces modifications entraînent une réaction inflammatoire et favorisent la colonisation et l'installation d'infections bactériennes précoces devenant rapidement chroniques. À un stade précoce, les principales bactéries en cause sont *H. influenzae*, *S. aureus*, et parfois *S. pneumoniae*. Puis une colonisation par *P. aeruginosa* survient et va jouer un rôle majeur dans l'évolution de la maladie au niveau respiratoire. D'autres agents peuvent être également associées à une évolution péjorative au décours de la maladie, notamment des champignons, *Mycobacterium abscessus* (mycobactéries à croissance rapide), mais aussi des espèces du genre *Burkholderia* (Tableau 17.5).

Les résultats bactériologiques des prélèvements respiratoires sont importants dans la mise en route et l'adaptation des traitements au cours de la maladie. Le prélèvement spontané ou au décours d'une séance de kinésithérapie permet des sécrétions du poumon profond. Les premiers crachats doivent être éliminés, puis après rinçage de la bouche à l'eau stérile avant d'effectuer le prélèvement pour éviter la contamination salivaire. Chez le petit enfant, cet examen se fait par une aspiration nasopharyngée stérile après kinésithérapie et/ou nébulisation avec du sérum physiologique. En dernier recours, un écouvillonnage du fond de la gorge pourra être pratiqué, sachant que c'est le prélèvement le moins performant dans la mucoviscidose. Un examen cytobactériologique des crachats (ECBC) doit être effectué tous les 3 mois de façon systématique ou plus souvent en fonction de l'état clinique.

L'examen microscopique doit être réalisé après coloration de MGG et de Gram. Les critères de rejet du prélèvement en fonction de la cytologie ne doivent pas être appliqués. Cependant, la qualité déficiente du prélèvement doit être mentionnée sur le compte-rendu.

Tableau 17.5 **Rôle pathogène et identification des principales bactéries isolées des expectorations de sujets atteints de mucoviscidose.**

Bactérie	Population cible prédominante	Prévalence	Rôle pathogène	Seuil de détection	Identification
Pseudomonas aeruginosa	Enf, Ado, Adu	+++	Certain	10^2 UFC/ml	Phénotypique
Staphylococcus aureus	Enf, Ado, Adu	+++	Certain	10^2 UFC/ml	Phénotypique
Streptococcus pneumoniae	Enf, Adu	+	Incertain	10^7 UFC/ml	Phénotypique
Hæmophilus influenzae	Enf	++	Incertain	10^7 UFC/ml	Phénotypique
Moraxella catarrhalis	Enf, Adu	+	Incertain	10^7 UFC/ml	Phénotypique
Burkholderia multivorans	Ado, Adu	+	Certain	10^2 UFC/ml	Moléculaire
Burkholderia cenocepacia	Ado, Adu	+	Certain	10^2 UFC/ml	Moléculaire
Stenotrophomonas maltophilia	Ado, Adu	+	Possible	10^5 UFC/ml	Phénotypique
Achromabacter xylosoxidans	Ado, Adu	+	Peu probable	10^5 UFC/ml	Phénotypique
Burkolderia gladioli	Ado, Adu	±	Peu probable	10^5 UFC/ml	Phénotypique
Pandorea spp.	Ado, Adu	±	Possible	10^5 UFC/ml	Moléculaire
Ralstonia spp., *Inquilinus* spp.	Ado, Adu	±	Peu probable	10^5 UFC/ml	Moléculaire
Entérobactéries	Enf, Ado, Adu	+	Incertain	10^7 UFC/ml	Phénotypique
Mycobactéries atypiques	Ado, Adu	+	Certain	ND	Moléculaire

Ado : adolescent ; Adu : adulte ; Enf ; enfant ; ND : non documenté.

Après homogénéisation à quantités égales des sécrétions et d'une solution de fluidificateur (solution à 10 % Digesteur®, Eurobio) et incubation (15 minutes à la température ambiante), l'ensemencement est ensuite réalisé.

- Ensemencer 10 µl à partir de la solution homogénéisée (1 colonie = 10^2 UFC/ml) sur un milieu sélectif pour *B. cepacia* (BCSA, OFPBL, PC ; 30 °C), un milieu sélectif pour *P. aeruginosa* (30 °C), une gélose permettant la croissance des bacilles à Gram négatif (CLED, BCP, MacConkey, Drigasky, etc.) et une gélose sélective pour *S. aureus* (37 °C) (Chapman, gélose chromogène), une gélose au sang frais ou au sang cuit additionné de facteurs de croissance évaluant la diversité de la flore,
- Ensemencer 10 µl après dilution dans de l'eau distillée de 100 µl de prélèvement dans 1 ml avec ensuite une dilution de 100 µl dans 10 ml du prélèvement homogénéisé (1 colonie = 10^5 UFC/ml), une gélose au sang cuit additionné de facteurs de croissance et sélective *Haemophilus* (37 °C, 5 à 10 % CO_2), une gélose au sang sélective (acide nalidixique ou colistine-aztréonam) pour bactérie à Gram positif (37 °C, CO_2 5 à 10 %) permettant la croissance de *S. pneumoniae* et *S. aureus*.

Les milieux sont observés à 24 heures puis tous les jours jusqu'à 5 jours. Une dissociation avec la présence de colonies naines de *S. aureus* doit être prise en compte et faire l'objet d'une étude de la sensibilité aux antibiotiques des différents morphotypes. Le caractère muqueux ou non de chaque morphotype de *P. aeruginosa* doit être précisé dans les résultats et faire également l'objet d'une étude de la sensibilité aux antibiotiques. La recherche de mycobactéries à croissance rapide doit être réalisée à intervalles réguliers (1 fois par an ou plus fréquemment s'il existe une dégradation de l'état pulmonaire), mais ne doit pas être effectuée systématiquement à chaque recueil. Les seuils et méthodes préconisées pour la recherche de chaque agent pathogènes sont précisés dans le tableau 17.5.

Conclusion

Les limites d'une documentation bactériologique des infections respiratoires basses à partir de prélèvements obtenus facilement, mais souvent d'origine salivaire et contaminés par une flore commensale (expectorations), imposent l'utilisation de moyens plus invasifs (aspiration, brossage, etc.) dans les situations graves, les manifestations chroniques ou après un échec thérapeutique. Outre la présence de bactéries commensales, la difficulté d'interprétation des résultats est également compliquée par la présence de bactéries potentiellement pathogènes en situation de portage (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*). Les prélèvements accompagnés de renseignements cliniques doivent être de qualité et adaptés aux recherches spécifiques demandées.

Pour en savoir plus

Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, et al. Guide to Utilization of the microbiology laboratory diagnosis of infectious disease. AM J Resp Crit Care Med 2005 ; 171 : 388–416.

Besier S, Smaczny C, von Malinck-Rodt C, et al. Prevalence and clinical significance of Staphylococcus aureus small-colony variants in Cystic fibrosis lung disease. J Clin Microbiol 2007 ; 45 : 168–72.

Gilligan PH, Kiska DL, Appleman MD. Cystic fibrosis microbiology. Washington, DC : Cumitech 43–ASM Press ; 2006.

Leroy O. Apport des explorations microbiologiques au diagnostic des infections des voies respiratoires basses. Med Mal Infect 2006 ; 36 : 570–98.

Reverdy ME, Girardo P, Berchiche C. Prélèvements en bactériologie clinique. In : Freney J, Renaud F, Leclerc R, Riegel P, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2007. p. 741–54.

Société Française de microbiologie. Infections bronchopulmonaires (hors tuberculose et mucoviscidose). In : REMIC, editors. Référentiel en microbiologie médicale ; 2015. p. 179–92.

Société Française de microbiologie. Diagnostic microbiologique des sécrétions bronchopulmonaires chez un patient mucovisicdosique. In : REMIC, editors. Référentiel en microbiologie médicale. 2015 ; p. 193–200.

Infections cutanées

C. Plainvert, J.-P. Lavigne et al.

PLAN DU CHAPITRE

18.1 Infections de la peau et des tissus mous

C. Plainvert, J. Loubinoux, C. Poyart

Introduction

Les infections bactériennes de la peau et des tissus mous sont fréquentes, constituant une part non négligeable de l'activité de routine d'un laboratoire de bactériologie. Ce type d'infections regroupe des formes cliniques très diverses selon la nature du tissu infecté (épiderme, derme, hypoderme, aponévrose, muscle), son caractère primitif ou secondaire (surinfection de dermatose virale ou chronique, post-traumatique) et son éventuelle nature nécrosante.

En fonction de la profondeur du tissu atteint (Fig. 18.1 et 18.2), on distingue trois classes de suppurations qui sont les suivantes :

- suppurations de classe I : les plus profondes, normalement fermées et stériles, sans communication avec l'extérieur ;
- suppurations de classe II : elles communiquent ou ont communiqué avec un site anatomique colonisé par la flore commensale cutanée susceptible de contaminer les prélèvements (suppurations fistulisées) ;
- suppurations de classe III : superficielles et ouvertes avec une forte colonisation par la flore commensale cutanée.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à ces trois types de suppurations responsables d'infections cutanées superficielles (classe III) et d'infections plus ou moins profondes des tissus mous (classes I et II). En revanche, les recherches de mycobactéries responsables d'infections cutanées et de *Neisseria meningitidis* dans les lésions purpuriques seront développées dans des chapitres spécifiques.

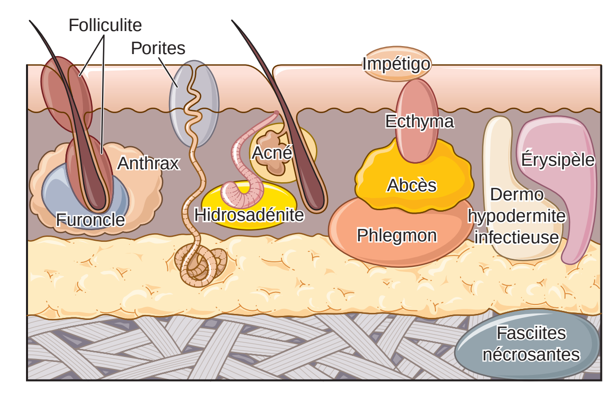


Fig. 18.1 Localisation anatomique des infections de la peau.

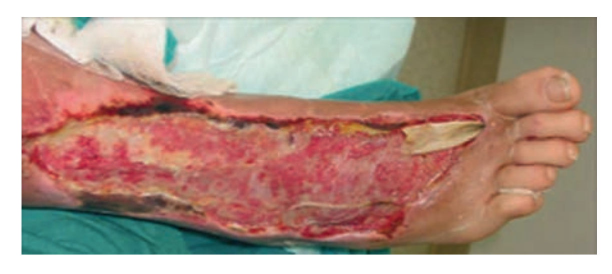


Fig. 18.2 Fasciite nécrosante. *(www.microbes-edu.org.)*

Prélèvements

Les prélèvements doivent être réalisés de préférence avant toute antibiothérapie. Les échantillons doivent être acheminés au laboratoire dans un sac hermétique, accompagnés d'une feuille de renseignements cliniques. Les informations cliniques sont essentielles pour la prise en charge et l'interprétation de l'examen (identification du type d'infection et de sa localisation, modalités de prélèvement, contexte clinique global (âge, état immunitaire, diabète, corticothérapie, etc.) et traitement antibiotique éventuel.

Modalités de prélèvement

Le prélèvement des suppurations de classes II et III doit être précédé d'une détersion au sérum physiologique stérile et d'une asepsie rigoureuse afin d'éviter la contamination de l'échantillon par la flore commensale cutanée. Les prélèvements réalisés à l'écouvillon sont à éviter le plus possible car facilement contaminés et non adaptés à la recherche de bactéries anaérobies. À défaut, l'écouvillon utilisé doit être accompagné d'un milieu de transport. Les prélèvements effectués à la seringue, les biopsies et pièces opératoires mises en récipient stérile doivent en revanche être privilégiés. Le prélèvement des échantillons de faible volume réalisé à l'aiguille fine montée sur une seringue peut être facilité par l'utilisation d'une faible quantité de sérum physiologique stérile préalablement injecté dans la lésion ou aspiré secondairement. L'expulsion préalable de l'air contenu dans la seringue est indispensable pour permettre la survie des bactéries anaérobies éventuellement présentes dans l'échantillon. La dessiccation des biopsies cutanées peut être prévenue par l'ajout de quelques gouttes de sérum physiologique stérile dans le récipient stérile. Dans le cas particulier des infections du pied diabétique, la biopsie tissulaire est à privilégier.

En dehors des prélèvements locaux, des hémocultures doivent également être prélevées car les infections bactériennes sévères s'accompagnent très souvent d'une bactériémie.

Transport

Les échantillons doivent arriver rapidement au laboratoire, dans un délai maximal de 2 heures à température ambiante afin d'optimiser la recherche des bactéries anaérobies. Si ce délai doit être dépassé, il est recommandé d'utiliser un milieu de transport.

Diagnostic

Le caractère précieux des échantillons prélevés au bloc opératoire et des biopsies s'accompagne d'une prise en charge sous poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II.

Objectifs de l'analyse bactériologique

Les bactéries recherchées seront différentes selon les modalités de prélèvement et la localisation de la suppuration.

- Suppurations de classe I : si les prélèvements sont effectués dans de bonnes conditions d'asepsie, les échantillons ont une faible probabilité de contenir des bactéries non impliquées dans l'infection. Les bactéries isolées sont directement en cause dans le processus infectieux.
- Suppurations de classe II : les échantillons peuvent contenir des bactéries non impliquées dans l'infection.
- Suppurations de classe III : les échantillons sont contaminés par des bactéries appartenant à la flore commensale.

Toutes les bactéries isolées des suppurations de classes II et III ne sont pas en cause dans le processus infectieux. L'examen bactériologique de ces suppurations tente d'imputer un lien causal entre une ou des bactéries pathogène(s) isolée(s) au sein de la flore cutanée résidente et la constitution de la suppuration.

Examen macroscopique

L'aspect macroscopique de l'échantillon constitue une information importante à noter (hémorragique, purulent, présence de grains, etc.).

Préparation de l'échantillon

Les échantillons solides doivent être broyés stérilement. Pour les échantillons prélevés sur écouvillons, l'un d'entre eux est réservé à l'examen direct et les autres à la culture.

Examen microscopique

L'examen microscopique après coloration de Gram du frottis de produit pathologique indique la quantité relative de leucocytes, de cellules épithéliales et la présence de bactéries. L'examen microscopique des échantillons de suppuration de classes II et III évalue également l'abondance relative de la flore.

Mise en culture

Du fait de la diversité des bactéries isolées, des milieux de culture enrichis sont nécessaires, ainsi que des milieux sélectifs, notamment pour les prélèvements contaminés par une flore commensale.

Sont ensemencées au minimum :

- une gélose au sang incubée en aérobiose ;
- une gélose au sang cuit avec supplément polyvitaminique incubée sous CO_2.

Peuvent être ajoutés en fonction des modalités de prélèvement (biopsie, prélèvement liquide, suspicion d'infection à bactérie anaérobie) et de l'examen microscopique :

- une gélose au sang incubée en anaérobiose ;
- un milieu liquide permettant la recherche d'anaérobies (Schaedler, cœur-cervelle, etc.) ;
- une gélose au sang + ANC incubée sous CO_2 ;
- une gélose ordinaire incubée en aérobiose pour les bactéries à Gram négatif (CLED, BCP, etc.) ;
- des flacons d'hémoculture (aérobie et anaérobie) peuvent être ensemencés au laboratoire si cela n'a pas déjà été fait au moment du prélèvement.

Les milieux de culture sont incubés à 35 à 37 °C au moins 48 heures en aérobiose. Pour la recherche de bactéries anaérobies ou de croissance lente, les milieux sont incubés en anaérobiose et sous CO_2 pour au moins 5 jours. L'incubation des milieux liquides est poursuivie au minimum 15 jours.

Conservation des échantillons pour analyse ultérieure

Les échantillons précieux (prélevés à la seringue, les biopsies et pièces opératoires) doivent être conservés à –80 °C pour d'éventuelles analyses ultérieures évoquées en fonction des premiers résultats bactériologiques (recherches particulières, biologie moléculaire, etc.) et de l'évolution clinique.

Interprétation des cultures positives

Étant donné la diversité des localisations, tout échantillon doit être accompagné de sa localisation précise et des renseignements cliniques indispensables pour

aider le bactériologiste dans sa démarche diagnostique. L'interprétation varie selon les modalités de prélèvement et la localisation anatomique de la suppuration (Tableaux 18.1 à 18.3, Fig. 18.1).

Anthrax, cellulite, érysipèle, impétigo, folliculite, furoncle

Staphylococcus aureus et *Streptococcus pyogenes* sont les bactéries les plus fréquemment impliquées (Fig. 18.3).

Fasciite nécrosante/dermohypodermite nécrosante

L'agent causal le plus fréquent est *S. pyogenes*, souvent associé à un mélange polymicrobien variable selon la localisation de la porte d'entrée (Fig. 18.2).

Morsure animale ou humaine

Selon l'origine de la morsure, seront recherchées les *Pasteurella*, les bactéries anaérobies et les bactéries de croissance plus difficile (*Capnocytophaga, Eikenella, Haemophilus*). Des *Streptococcus* spp. et *S. aureus* de culture plus facile peuvent également être impliqués (Tableaux 18.2). Il est à noter que les prélèvements de morsure sont souvent plurimicrobiens.

Plaie contaminée par de la terre

La culture des bactéries anaérobies doit être réalisée, notamment la recherche de *Clostridium* et *Bacillus*.

Brûlures

Les bactéries les plus fréquemment isolées dans les infections sont *S. aureus*, les entérobactéries et *P. aeruginosa*. Les entérocoques, *Acinetobacter* spp. et *Stenotrophomonas maltophilia* sont également retrouvés. Les streptocoques β-hémolytiques et les bactéries anaérobies sont plus rarement isolés.

Escarres, ulcérations

Une culture polymicrobienne est généralement obtenue avec ce type de suppuration. Cependant, des bactéries pathogènes telles que *S. aureus*, les streptocoques β-hémolytiques et *P. aeruginosa* peuvent être cliniquement significatives lorsqu'elles sont présentes en grande quantité.

Infection du pied diabétique

Les bactéries pathogènes à Gram positif sont les plus fréquentes (*S. aureus* et streptocoques β-hémolytiques), souvent associées à d'autres bactéries dont des entérobactéries et *P. aeruginosa* (Tableaux 18.3). Les bactéries anaérobies (*Bacteroides* spp.) sont souvent associées à des bactéries aéro-anaérobies facultatives.
Le cas particulier de ces infections est traité dans le chapitre 18.2.

Lésions granulomateuses

La recherche de mycobactéries, de *Francisella*, et de *Nocardia* s'ajoute à la recherche de bactéries dont la culture est plus facile.

Tableau 18.1 **Principaux germes identifiés en fonction du type de lésion.**

Tissus non nécrosés			Tissus nécrosés	
	Germes			Germes
Tableau	**Les plus fréquents**	**Moins fréquents**	**Tableau**	**Usuels**
Abcès cutané	*Staphylococcus aureus*		Cellulite *anaérobie*	*Clostridium perfringens* Mélanges aéro-anaérobies
Anthrax	*S. aureus*		Fasciite nécrosante	Mélanges aéro-anaérobies *S. pyogenes*
Cellulite	*S. aureus* *Streptococcus pyogenes*	*Haemophilus influenzae* *Pasteurella multocida* *Enterobacteriaceae* *Aeromonas* spp.	Gangrène *gazeuse*	*C. perfringens*, *C. septicum*, etc.
Ecthyma	*S. aureus* *S. pyogenes*	*Pseudomonas aeruginosa*	Progressif	*Streptococcus* spp. + *S. aureus* (voire *Proteus* spp.)
Érythrasma	*Corynebacterium minutissimum*			
Érysipèle	*S. pyogenes*	Streptocoque β-hémolytique des groupes B, C et G *P. aeruginosa* *S. aureus*		
Folliculite	*S. aureus*	*P. aeruginosa*		
Furoncle	*S. aureus*			
Impétigo	*S. pyogenes* *S. aureus*			
Panaris	*S. aureus*	*S. pyogenes*		

Tableau 18.2 **Germes identifiés dans les morsures.**

Nature de la morsure	Germes	Fréquence
Chat	*Pasteurella multocida* Anaérobies, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Capnocytophaga canimorsus*, *Eikenella corrodens*	+++ ++ ++
Chien	*Pasteurella multocida* Anaérobies, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus* *Capnocytophaga canimorsus*, *Eikenella corrodens*	+++ ++ +
Humain	*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *anaérobies* *Eikenella corrodens* *Haemophilus influenzae*	++ ++ +
Rat	*Streptobacillus moniliformis*	Exceptionnel

+++ : fréquent; ++ : peu fréquent; + : rare.

Tableau 18.3 **Germes identifiés dans les infections du pied diabétique.**

Aspect de la plaie	Germes usuels
Superficielle	*Staphylococcus aureus*, streptocoques β-hémolytiques
Chronique	*S. aureus*, streptocoques β-hémolytiques, entérobactéries
Lésion macérée	*Pseudomonas* en association à d'autres espèces bactériennes
Ulcère ≥ 6 mois	Polymicrobisme : *S. aureus*, streptocoques β-hémolytiques, entérocoques, corynébactéries, entérobactéries, *Pseudomonas*, bacilles à Gram négatif non fermentatifs
Nécrose, gangrène	Cocci à Gram positif aérobie, entérobactéries, *Pseudomonas*, bacilles à Gram négatif non fermentatifs, anaérobies stricts





Fig. 18.3 Impétigo (A) et érysipèle (B). *(www.microbes-edu.org.)*

Étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques

Un antibiogramme doit être réalisé sur les souches cliniquement importantes selon les critères d'interprétation mentionnés précédemment. L'antibiogramme doit être réalisé selon les recommandations du CA-SFM.

Conservation des souches isolées

Il est conseillé de conserver les souches bactériennes cliniquement significatives par congélation à une température de –20 °C à –80 °C en présence d'un cryoprotecteur ou par piqûre en gélose profonde.

Diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire est complémentaire de la culture ; il est souvent réalisé dans un second temps au cours du diagnostic bactériologique. La recherche d'ADN bactériens par PCR dans les échantillons biologiques peut être très utile, notamment en cas de traitement antibiotique concomitant au prélèvement, ou de bactéries à croissance lente ou difficile. Deux types de cibles génomiques peuvent être recherchés : spécifiques (amorces spécifiques d'espèce) ou universels (amorces universelles permettant d'amplifier un fragment du gène codant l'ARN ribosomal 16S).

Diagnostic indirect

Certaines manifestations cutanées résultent d'infections par des bactéries difficilement cultivables et pour lesquelles le diagnostic repose sur la sérologie et la détection par PCR de constituants bactériens. Il s'agit notamment de *Borrelia burgdorferi*, l'agent de la maladie de Lyme, de *Bartonella*, responsable de la maladie des griffes du chat, et de *Francisella tularensis* identifié dans la tularémie. La recherche spécifique de chacun de ces trois germes est abordée dans des chapitres dédiés.

Conclusion

Le diagnostic bactériologique des infections de la peau et des tissus mous est largement dépendant des modalités de prélèvement des échantillons biologiques compte tenu

de l'abondance de la flore cutanée. Si plus de trois espèces bactériennes sont isolées, la pertinence de l'identification et de l'antibiogramme systématique est faible. Les informations cliniques sont alors essentielles à la prise en charge de l'échantillon biologique. La confrontation de ces informations avec l'examen microscopique et la culture bactériologique favorise une interprétation fiable.

Pour en savoir plus

CMIT. Infections du pied diabétique. In : Pilly E, editor. Infections cutanées à pyogènes. Dermohypodermites aiguës bactériennes : de l'érysipèle à la fasciite nécrosante. Pathologies d'inoculation. Vivactis Plus Ed; 2010. p. 229–36.

Ploy MC, Denis F. Analyse cytobactériologique des pus. In : Denis F, Ploy MC, Martin C, et al., editors. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson; 2007. p. 199–204.

Société française de microbiologie. Examen microbiologique des lésions et suppurations cutanées. Examen bactériologique d'un pied diabétique. Examen microbiologique chez un brûlé. In : REMIC, editor. Société Française de Microbiologie; 2010. p. 147–88.

18.2 Prélèvements du pied diabétique

J.-P. Lavigne

Introduction

Les ulcérations du pied sont fréquentes chez les patients diabétiques : près de 25 % d'entre eux en feront une au cours de leur vie. Secondairement, ces ulcérations s'infectent dans 40 à 80 % des cas, augmentant significativement la morbidité et la mortalité des patients. Ces plaies représentent une des principales causes d'amputations des membres inférieurs.

La difficulté de la prise en charge de ces plaies réside dans la nécessité de différencier les infections des colonisations et donc de savoir quand et comment effectuer un prélèvement microbiologique.

Physiopathologie

Les patients diabétiques sont plus exposés que la population générale aux infections et en particulier à celles localisées au niveau du pied.

Les mécanismes physiopathologiques de l'infection du pied diabétique sont divers. La fréquence des infections chez le diabétique serait en rapport avec un déficit des mécanismes cellulaires de défense majoré par l'hyperglycémie, capable d'altérer les fonctions des leucocytes (phagocytose, adhérence, bactéricidie, chimiotactisme). En outre, l'hyperglycémie favorise les phénomènes d'apoptose et est à l'origine de perturbations hémorhéologiques responsables de troubles de la vascularisation distale.

L'effet délétère de la neuropathie et de l'hyperpression sur la plaie est également invoqué. L'indolence de la plaie liée à la neuropathie retarde son diagnostic et sa prise en charge, et la persistance des forces de pression ou de friction s'exerçant sur l'ulcération lors de la marche facilite ainsi la survenue d'une infection et sa diffusion. L'absence de mise en décharge de la plaie est un facteur déterminant de l'évolution vers l'infection, ainsi qu'en témoigne le moindre taux d'infection et d'amputation en cas de plaies efficacement déchargées.

La chronicité de la lésion joue vraisemblablement aussi un rôle délétère dans l'infection, comme le suggère la diminution de l'incidence des ostéites et des amputations lorsque le temps de cicatrisation est raccourci.

L'hypoxie est souvent impliquée, fréquente dans les ulcérations chroniques, conséquence d'une mauvaise perfusion locale et aggravée par l'hypermétabolisme de l'hôte et le métabolisme cellulaire microbien; la mort cellulaire et la nécrose tissulaire liées à l'hypoxie créent des conditions optimales à la prolifération microbienne. Celle-ci favorise les infections sous-cutanées à anaérobies et diminue la bactéricidie des neutrophiles.

La sévérité particulière des infections chez le diabétique peut s'expliquer par une atteinte artérielle diminuant l'afflux de sang au site de la plaie et ainsi des facteurs endogènes impliqués dans la lutte contre l'infection. Cette artériopathie réduit la pénétration des antibiotiques au niveau des tissus ischémiés. Enfin, l'anatomie particulière du pied, cloisonné en plusieurs loges, peut expliquer la diffusion rapide du processus infectieux.

Pathogenèse

Toutes les plaies chroniques sont colonisées par des bactéries. De fait, le diagnostic d'infection de plaie du pied chez le diabétique ne peut être fondé uniquement sur un résultat bactériologique d'un prélèvement de plaie mais doit être confronté à la clinique. Des critères cliniques sont utilisés pour classifier la sévérité de l'infection des plaies du pied (Tableau 18.4). Cependant, les manifestations cliniques retenues dans cette classification peuvent être réduites chez le diabétique. Il est donc tout à fait possible que certaines infections ne soient pas détectées lors de leur présentation initiale. Ce délai dans la mise en route d'un traitement adapté peut conduire à l'extension de l'infection pouvant mettre en danger l'intégrité du membre inférieur. Cette progression peut être rapide car elle est associée à un terrain la favorisant.

De très nombreuses bactéries sont responsables d'infections des plaies du pied. Les bactéries aérobies à Gram positif sont les plus fréquentes avec *Staphylococcus aureus* ou les streptocoques β-hémolytiques. Cette prédominance des bactéries à Gram positif n'est observée que dans les pays occidentaux. Les bacilles aérobies à Gram négatif, essentiellement de la famille des entérobactéries (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.), se rencontrent généralement en cas d'infections chroniques ou déjà traitées. *Pseudomonas aeruginosa* est volontiers isolé après des hospitalisations de longue durée, l'application de pansements humides, ou des

Tableau 18.4 **Classification de l'infection des plaies du pied chez le diabétique – PEDIS (perfusion, étendue/taille, profondeur (*depth*)/perte tissulaire, infection, sensibilité).**

Sévérité de l'infection (IDSA)	Grade PEDIS	Critères cliniques
Non infectée	Grade 1	Pas de symptôme, ni de signe d'infection
Légère	Grade 2	Atteinte cutanée uniquement (sans atteinte des tissus sous-cutanés, ni systémique) avec au moins deux des signes suivants : – chaleur locale – érythème > 0,5–2 cm autour de l'ulcère – sensibilité locale ou douleur – tuméfaction locale ou induration – décharge purulente (sécrétion épaisse, opaque à blanchâtre ou sanguinolente) Les autres causes de réaction inflammatoire de la peau doivent être éliminées (par exemple traumatisme, goutte, pied de Charcot aigu, fracture, thrombose, stase veineuse)
Modérée	Grade 3	– Érythème > 2 cm et une des constatations décrites ci-dessus ou – Infection atteignant les structures au-delà de la peau et du tissu sous-cutané, comme un abcès profond, une lymphangite, une ostéite, une arthrite septique ou une fasciite. Il ne doit pas y avoir de réponse inflammatoire systémique (voir grade 4)
Sévère*	Grade 4	Quelle que soit l'infection locale, si présence de signes systémiques (SRIS) manifestée par au moins deux des caractéristiques suivantes : température > 38 ou < 36 °C fréquence cardiaque > 90 battements/min fréquence respiratoire > 20 cycles/min $PaCO_2$ < 32 mmHg leucocytes > 12 000 ou < 4000/mm^3 ≥ 10 % de formes leucocytaires immatures

IDSA, Infectious Diseases Society of America ; SRIS : syndrome de réponse inflammatoire systémique.
* L'ischémie peut augmenter la gravité de toute infection, et la présence d'ischémie critique rend souvent l'infection sévère. L'infection systémique peut parfois s'associer à d'autres situations cliniques, comme l'hypotension, la confusion, les vomissements, ou des troubles métaboliques, tels que l'acidose, l'hyperglycémie sévère et une azotémie d'apparition récente.

bains de pied. C'est la bactérie la plus fréquemment isolée dans les pays en voie de développement (Asie du Sud-Est notamment). Son rôle pathogène est cependant à discuter. Enfin, les bactéries anaérobies strictes, le plus souvent cocci à Gram positif mais aussi bacilles à Gram négatif, sont souvent associées à des bactéries aérobies.

L'écologie bactérienne des ostéites, différentes des ostéites sur matériel, est présentée dans le tableau 18.5.

Prélèvements

Objectif

L'objectif de l'analyse bactériologique est de mettre en évidence les bactéries responsables de l'infection et de réaliser l'étude de leur sensibilité aux antibiotiques.

Indications

Les prélèvements bactériologiques ne sont indiqués qu'en cas d'infection établie cliniquement. Les plaies sans signes cliniques (locaux ou généraux) d'infection (grade 1 du PEDIS [voir Tableau 18.6]) ne doivent pas être prélevées. Une prise en charge multidisciplinaire est indispensable chez ces patients. Les protocoles de prélèvement doivent être conçus conjointement par les cliniciens et les microbiologistes en suivant les recommandations du Tableau 18.6.

Réalisation

Débridement

Les lésions sont toujours colonisées superficiellement par une flore bactérienne qui n'a pas nécessairement de signification pathologique. C'est la raison pour laquelle, avant tout prélèvement, la plaie doit être préparée.

Le débridement a pour but d'exciser les parties molles nécrosées, les tissus dévitalisés et contaminés ainsi que les tissus fibreux pour ne laisser en place que du tissu sain et ainsi faciliter la cicatrisation de la plaie (ré-épithélialisation tissulaire favorisée).

L'importance du débridement dépendra du type d'ulcération :

- ulcérations à prédominance neuropathique : le débridement doit être appuyé jusqu'à parvenir au tissu sain, et ce facilement en raison de l'absence de douleurs ;
- ulcères ischémiques : le débridement doit être très prudent et se limiter à un simple drainage. Il est recommandé que la prise en charge vasculaire soit réalisée avant toute investigation bactériologique.

Deux types de prélèvement peuvent être réalisés :

- chirurgical : c'est le prélèvement le plus performant en termes de documentation microbiologique. Il doit être fait au bloc opératoire par un chirurgien spécialisé dans les conditions d'asepsie rigoureuses. Ce débridement a des actions à visée diagnostique (exploration des dif-

Tableau 18.5 **Ecologie des ostéites des plaies du pied chez le diabétique.**

Bactéries/ Références	Wheat et al., 1986, Arch Intern Med	Newman et al., 1991, JAMA	Lavery et al., 1995, J Foot Ankle Surg	Senneville et al., 2006, Clin Infect Dis	Aragon-Sanchez et al., 2008, Diabetologia	Aragon-Sanchez et al., 2010, Diabetic foot Ankle	Malizos et al., 2010, Injury	Lesens et al., 2011, Clin Microbiol Infect	Elamurugan et al., 2011, Int J Surg
Cocci à Gram positif									
S. aureus	40 %	31 %	47 %	26 %	47 %	38 %	86 %	33 %	31 %
SCN	10 %	50 %	11 %	26 %	11 %	12 %	10 %	14 %	–
Streptocoques	45 %	27 %	61 %	12 %	3 %	1 %	–	9 %	3 %
Enterococcus spp.	30 %	8 %	28 %	8 %	1 %	–	18 %	12 %	–
Autre	10 %	–	–	2 %	–	–	–	4 %	2 %
Bacilles à Gram négatif									
Entérobactéries	55 %	20 %	14 %	18 %	29 %	36 %	11 %	18 %	32 %
Pseudomonas spp.	5 %	15 %	11 %	2 %	9 %	10 %	43 %	2 %	19 %
Acinetobacter spp.	–	–	–	–	–	3 %	–	–	13 %
Anaérobies	60 %	4 %	15 %	5 %	–	–	–	4 %	–
Polymicrobien	70 %	ND	83 %	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND, non déterminé ; SCN, staphylocoques à coagulase négative.

Tableau 18.6 **Recommandations pour les prélèvements microbiologiques d'une plaie du pied chez le diabétique.**

À faire
Les prélèvements bactériologiques ne doivent être pratiqués que si l'infection de la plaie est confirmée cliniquement (grades 2–4 PEDIS) Nettoyer et débrider la plaie (chirurgicalement ou mécaniquement) avant tout prélèvement Obtenir un prélèvement tissulaire soit en grattant avec un scalpel ou une curette stérile, soit en utilisant une punch biopsie à la base de la plaie débridée Aspirer les sécrétions purulentes avec une seringue et une aiguille stérile en passant en peau saine Pour les suspicions d'ostéites, réaliser une biopsie osseuse soit au bloc chirurgical, soit par prélèvement percutané écho- ou radioguidé en passant par la peau saine Envoyer rapidement les prélèvements dans un pot stérile avec quelques gouttes de sérum stérile (pour éviter la dessiccation) ou dans un milieu de transport approprié, pour effectuer les cultures aérobies/anaérobies (et la coloration de Gram si possible) Ne répéter les prélèvements que si l'infection ne guérit pas malgré la mise sous antibiotiques ou si l'infection est sévère
À ne pas faire
Prélever une plaie colonisée (grade 1 PEDIS) Obtenir un prélèvement sans nettoyage ou débridement de la plaie Faire un prélèvement par écouvillonnage simple Effectuer un prélèvement superficiel lorsque l'infection est profonde

férents compartiments du pied pour voir l'extension de l'infection), pronostique (réalisation de prélèvements bactériologiques fiables), thérapeutique (exérèse des tissus nécrosés et réduction de l'inoculum bactérien) et préventive (correction des déformations du pied pour éviter les récidives) ;

- mécanique : le prélèvement est pratiqué au lit du malade par un médecin ou un(e) infirmier(ère) spécialisés, au moyen d'un scalpel ou d'une curette stérile. Un nettoyage est réalisé avec de la gaze imbibée de sérum physiologique stérile. L'utilisation d'antiseptiques est possible ; ils doivent être appliqués sur les bords de la plaie puis éliminés par du sérum physiologique stérile avant de réaliser le prélèvement. Ils participent à limiter/éliminer la microflore commensale cutanée.

Prélèvements en cas d'infection des parties molles

Les méthodes de prélèvement s'adaptent à la nature des lésions. D'emblée, il faut indiquer que l'écouvillonnage superficiel de la plaie est la moins bonne des techniques de prélèvement. La figure 18.4 présente les différentes méthodes à réaliser en fonction du type de plaie.

Écouvillonnage superficiel de la plaie

Cette méthode de prélèvement est la plus utilisée. Sans débridement, elle a un intérêt limité. Elle est peu adaptée à la mise en évidence optimale des bactéries réellement responsables de l'infection. Aucune méthodologie n'est validée. Le plus souvent, un écouvillon est passé sur une surface de 1 cm^2 de plaie dans un mouvement de zigzag combiné avec un mouvement de rotation. Cette méthode recueille des bactéries, mais il est ensuite difficile de distinguer la microflore de colonisation des bactéries responsables de l'infection. L'écouvillon doit être placé dans un milieu de transport. La recherche de bactéries anaérobies strictes n'est habituellement pas réalisée sur ce type d'échantillon.

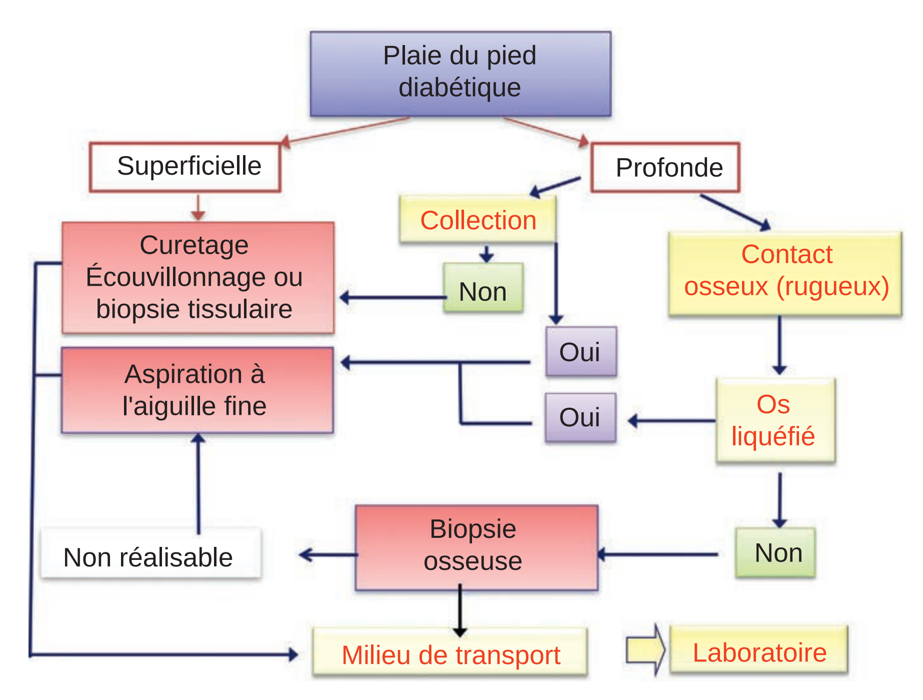


Fig. 18.4 **Différentes approches diagnostiques en fonction du type de plaie du pied diabétique.**

Curetage – écouvillonnage profond de l'ulcère

Cela permet de prélever du tissu par grattage de la base de l'ulcère avec une curette stérile. Les produits de curetage sont récupérés par écouvillonnage. L'écouvillon est immédiatement placé dans un milieu de transport permettant une culture aérobie et anaérobie.

Biopsie tissulaire

C'est la méthode à privilégier. Elle peut être réalisée au lit du patient surtout en cas de neuropathie sévère, après une préparation de la peau (débridement, excision des tissus nécrosés après un nettoyage soigneux). Deux à trois fragments de tissu sont prélevés (à l'aide de « punch biopsie », ce qui permet d'obtenir une carotte de tissu) à partir de zones différentes en fonction de l'étendue de la plaie et placés immédiatement dans un flacon stérile additionné de quelques gouttes de sérum physiologique stérile pour éviter la dessiccation.

Aspiration à l'aiguille fine ou au cathéter long

Cette technique permet de prélever les plaies profondes et en particulier les infections collectées. La ponction est effectuée au travers d'une zone saine désinfectée au préalable. Si aucun liquide n'est aspiré, 1 à 2 ml de sérum physiologique sont injectés et aspirés à l'aide d'une seconde aiguille. Dans tous les cas, la seringue (du type de celle utilisée pour la mesure des gaz du sang) ayant servi au prélèvement est rapidement adressée au laboratoire sans l'aiguille, purgée d'air, bouchée hermétiquement et stérilement.

Prélèvements à réaliser en cas d'ostéite aiguë

Ces prélèvements s'effectuent uniquement par biopsie osseuse (méthode de référence). Cette biopsie est rapide, simple et sans effet secondaire pour le patient, mais elle doit être réalisée dans des centres spécialisés par des médecins/chirurgiens spécialistes.

En cas d'échec d'une première antibiothérapie, la biopsie doit être réalisée après une fenêtre thérapeutique de 15 jours au minimum.

La biopsie osseuse peut être obtenue :

- par un geste chirurgical au bloc opératoire, si le centre possède un chirurgien spécialisé dans cette prise en charge. Cinq prélèvements au maximum sont alors recommandés au niveau de la lésion ;
- par ponction percutanée radio- ou échoguidée effectuée par un radiologue en passant le trocart (de type myélogramme) au travers de la peau saine après désinfection la plus complète possible. Ce geste peut être réalisé sans anesthésie locale chez de nombreux patients diabétiques du fait de la neuropathie sensitive. Plusieurs zones peuvent être prélevées.

Quelle que soit la technique utilisée, le ou les échantillon(s) doi(ven)t permettre la réalisation d'une culture aérobie et anaérobie. Pour la culture aérobie, on ajoute un peu de sérum physiologique à l'échantillon d'afin d'éviter la dessiccation. Pour la culture anaérobie, une aliquote de l'échantillon est placée dans un milieu de transport adapté. Un milieu de transport peut également servir pour la culture aérobie. Un examen histopathologique doit compléter l'analyse. Il doit être interprété par un anatomopathologiste spécialisé dans le domaine.

Prélèvements à réaliser en cas de sepsis

Les hémocultures aérobies et anaérobies sont réalisées lors du grade 4 de la classification PEDIS (Tableau 18.4) en suivant les recommandations de réalisation de cet examen.

Transport et stockage

Selon les préconisations habituelles, ces échantillons sont transmis le plus rapidement possible au laboratoire à température ambiante dans des milieux de transport adaptés, ce qui nécessite une collaboration étroite entre cliniciens, infirmiers(ères) et coursiers, en raison du risque important de dessiccation et de lyse bactérienne. L'ensemencement direct de flacons d'hémoculture n'est pas recommandé en raison du risque de multiplication de la microflore commensale non pathogène au détriment des bactéries réellement infectantes.

Démarche du diagnostic bactériologique

Examen direct

Sur chaque échantillon, une coloration de Gram doit être réalisée. Elle donne une orientation sur les bactéries présentes au cours de l'infection.

Mise en culture

Sur chaque échantillon, une culture aérobie et, éventuellement, une culture anaérobie sont réalisées.

Le biologiste doit être informé des circonstances exactes d'obtention des échantillons biologiques (par exemple, le mode et la nature du prélèvement, le grade clinique, l'administration d'antibiotiques). Ces paramètres ne peuvent être connus que par une collaboration étroite entre le biologiste et le clinicien.

Débridement – écouvillonnage (superficiel et profond)

Ces écouvillons sont ensemencés directement au minimum sur les milieux gélosés suivants : gélose au sang, gélose au sang cuit supplémentée en facteurs de croissance et milieu sélectif pour entérobactéries incubées à environ 35 °C pendant 7 jours. La culture anaérobie peut être réalisée sur milieu préréduit au sang, additionné d'hémine et de vitamine K_1, si le maintien de la chaîne d'anaérobiose a été respecté. Elle sera incubée pendant 7 jours.

Aspiration à l'aiguille fine ou au cathéter long

L'ensemencement se réalise sur les mêmes milieux que ceux décrits pour les écouvillons. L'ensemencement d'un milieu d'enrichissement augmente la sensibilité de l'examen. Une culture anaérobie doit être réalisée. Les prélèvements doivent être incubés pendant 7 jours.

Biopsie tissulaire ou osseuse

Les fragments sont découpés et broyés, sous PSM II, en présence de sérum physiologique stérile. Outre l'ensemencement sur les mêmes milieux que ci-dessus, l'ensemencement d'un milieu d'enrichissement augmente la sensibilité de l'examen. Une culture anaérobie doit aussi être réalisée.

Il n'y a pas de corrélation entre l'analyse quantitative des bactéries présentes dans les tissus et le tableau clinique. La corrélation entre les résultats fournis par la coloration de Gram et ceux de la culture est faible. La concordance entre les prélèvements superficiels ou profonds à l'aiguille fine et la biopsie osseuse est également faible. Les prélèvements doivent être incubés pendant 7 jours.

Interprétation

L'interprétation des résultats est rarement simple. Elle dépend de la nature de l'échantillon et de la qualité du prélèvement, du conditionnement et de l'acheminement. Elle dépend également de la nature des bactéries isolées. Toutes ces données sont à prendre en compte pour pouvoir incriminer les bactéries mises en évidence dans l'infection. La figure 18.5 résume la conduite à tenir clinicobiologique dans l'interprétation des résultats microbiologiques. Le tableau 18.7 montre les corrélations clinicobactériologiques entre les types de plaies et les bactéries impliquées et identifiées.

En première intention, les bactéries commensales ou de colonisation ne sont pas prises en compte. Ce sont, par exemple, les staphylocoques à coagulase négative, les corynébactéries, les entérocoques et *Pseudomonas aeruginosa*. Leur rôle pathogène doit toujours être discuté, surtout lors d'infections superficielles. Cependant, ces bactéries peuvent aussi se comporter comme des pathogènes opportunistes (notamment lorsqu'elles sont détectées dans des prélèvements profonds osseux; Tableau 18.5). Il n'existe aucun critère pour être certain que les bactéries isolées sont responsables de l'infection cliniquement observée.

Des bactéries peu virulentes ou commensales sont prises en compte si elles sont isolées à plusieurs reprises, sur des prélèvements répétés et de qualité, ou si le patient présente un état septique inquiétant.

Parmi les bactéries considérées comme pathogènes, les bactéries à Gram positif sont les plus fréquentes. Il s'agit souvent de *Staphylococcus aureus* en culture pure ou polymicrobienne. Les streptocoques β-hémolytiques sont fréquemment isolés, souvent associés à d'autres bactéries. Les bacilles à Gram négatif isolés dans ce contexte sont le plus souvent des entérobactéries (*Proteus mirabilis, Escherichia coli, Klebsiella* spp.) qui s'observent lors d'infections profondes, chroniques ou déjà traitées. Les bactéries anaérobies strictes sont très diverses et souvent associées à des bactéries aérobies-anaérobies facultatives. *Finegoldia magna* et *Bacteroides* spp. sont les plus pathogènes. Les études par métagénomique des plaies montrent que ces bactéries sont constamment présentes dans des plaies profondes.

Un antibiogramme sera réalisé sur les bactéries considérées comme pathogènes. Les bactéries isolées peuvent être multirésistantes, surtout quand le patient a déjà subi de nombreuses hospitalisations. L'isolement de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) n'est pas synonyme de virulence accrue.

Conclusion

Les infections des plaies du pied chez les diabétiques sont la principale cause d'hospitalisation des diabétiques et l'une des causes majeures d'amputations des membres inférieurs en France. Pour toutes ces raisons, cette pathologie est un vrai

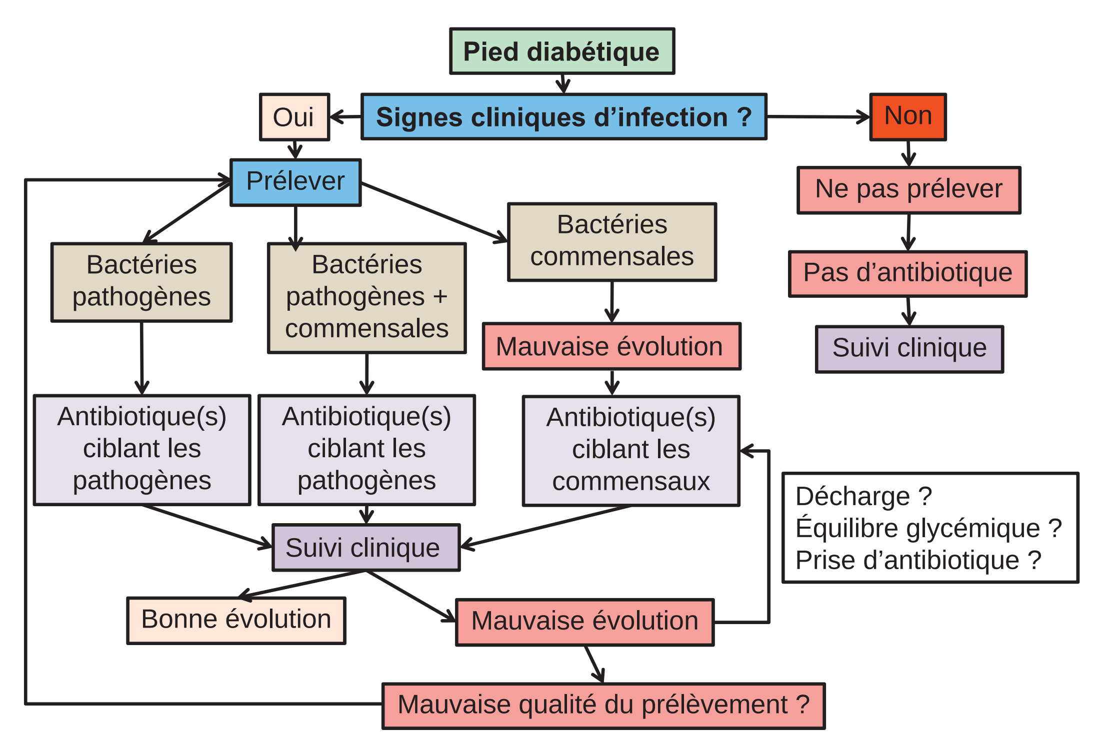


Fig. 18.5 **Interprétation des résultats bactériologiques sur prélèvement de pied diabétique.**

Tableau 18.7 Corrélation clinicobactériologique entre les types de plaies et les bactéries impliquées et identifiées.

Type de plaie du pied	Pathogènes
Plaie superficielle récente sans antibiothérapie récente	*Staphylococcus aureus*, streptocoques β-hémolytiques
Plaie chronique (≥ 1 mois) ou antérieurement traitée par antibiotiques	*Staphylococcus aureus*, streptocoques β-hémolytiques, entérobactéries
Plaie traitée par des céphalosporines d'évolution défavorable	Entérocoques
Lésion macérée	*Pseudomonas* spp. (en association avec d'autres micro-organismes)
Plaie de longue durée (ulcère ≥ 6 mois), traitement antérieur par des antibiotiques à large spectre	Polymicrobisme : cocci à Gram positif aérobie (*Staphylococcus aureus*, streptocoques β-hémolytiques, staphylocoques à coagulase négative, entérocoques), corynébactéries, entérobactéries, *Pseudomonas* spp., bacilles à Gram négatif non fermentatifs ± agents fongiques
Odeur nauséabonde, nécrose, gangrène	Cocci à Gram positif aérobie, entérobactéries, *Pseudomonas* spp., bacilles à Gram négatif non fermentatifs, anaérobies stricts

problème de santé publique et un diagnostic rapide avec un traitement efficace est essentiel. L'identification et la prise en charge des infections des plaies du pied chez le diabétique sont souvent problématiques du fait de difficultés dans 1) la différenciation infection/colonisation ; 2) l'évaluation de l'extension de l'infection ; 3) la mise en place d'un traitement efficace du fait de l'augmentation de la fréquence des bactéries multirésistantes et de l'altération des propriétés pharmacocinétiques des antibiotiques due au mauvais état vasculaire des artères du pied du patient ; 4) la durée du traitement car cette durée n'est pas clairement définie du fait du manque d'études (notamment lors d'ostéites). Toutefois, le développement de critères cliniques pour reconnaître et classer la sévérité des infections des plaies du pied chez le diabétique, l'optimisation des techniques de prélèvements en privilégiant des prélèvements profonds, le développement de techniques rapides de biologie moléculaire pour analyser le potentiel de virulence et de résistance des pathogènes et la mise sur le marché de nouveaux antibiotiques anti-*S. aureus* pourront aider dans l'avenir le clinicien à améliorer la prise en charge de ces pathologies.

Pour en savoir plus

Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. Clin Microbiol Rev 2001 ; 14 : 244–69.

Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet 2005 ; 366 : 1736–43.

Gardner SE, Hillis SL, Heilmann K, et al. The neuropathic diabetic foot ulcer microbiome is associated with clinical factors. Diabetes 2013 ; 62 : 923–30.

Jeffcoate WJ, Lipsky BA, Berendt AR, et al. Unresolved issues in the management of ulcers of the foot in diabetes. Diabet Med 2008 ; 25 : 1380–9.
Lavery LA, Armstrong DG, Wunderlich RP, et al. Diabetic foot syndrome : evaluating the prevalence and incidence of foot pathology in Mexican Americans and non-Hispanic whites from a diabetes disease management cohort. Diabetes Care 2003 ; 26 : 1435–8.
Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG, et al. Diagnosis and treatment of diabetic foot infection. Clin Infect Dis 2004 ; 39 : 885–910.
Lipsky BA. A report from the international consensus on diagnosing and treating the infected diabetic foot. Diabetes Metab Res Rev 2004 ; 20 : S68–77.
O'Mear S, Nelson EA, Golder S, et al. Systematic review of methods to diagnose infection in foot ulcers in diabetes. Diabet Med 2006 ; 23 : 341–7.
Prompers L, Huijberts M, Schaper N, et al. Resource utilisation and costs associated with the treatment of diabetic foot ulcers. Prospective data from the Eurodiale study. Diabetologia 2008 ; 51 : 1826–34.
Senior C. Assessment of infection in diabetic foot ulcers. J Wound Care 2000 ; 9 : 313–7.
Singh N, Armstrong DG, Lispky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. JAMA 2005 ; 293 : 217–28.
SPILF, Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. Recommandations pour la pratique clinique de la prise en charge des plaies infectées chez le diabétique. Med Mal Infect 2007 ; 37 : 26–50.
Ulbrecht JS, Cavanagh PR, Caputo GM. Foot problems in diabetes : an overview. Clin Infect Dis 2004 ; 39 : S73–82.

Chapitre 19

Suppurations profondes

J. Loubinoux, C. Plainvert, C. Poyart

PLAN DU CHAPITRE

Introduction

Les suppurations profondes sont des infections localisées en profondeur qui peuvent être primitives ou secondaires. Elles sont la conséquence d'un foyer infectieux local ou éloigné (métastase septique). Elles peuvent également résulter d'un traumatisme ou d'un geste médical ou chirurgical. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux suppurations closes, aux suppurations fistulisées, aux liquides d'épanchement et aux suppurations des séreuses (les liquides articulaires font l'objet du chapitre suivant).

Les suppurations closes peuvent atteindre tous les organes. Les suppurations fistulisées constituent une complication des suppurations closes et peuvent être colonisées par des bactéries commensales non impliquées dans le processus infectieux. On distingue deux classes de suppurations closes :

- suppurations de classe I : elles sont normalement fermées et stériles, sans relation avec l'extérieur (abcès cérébral, abcès hépatique, adénopathie, etc.) ;
- suppurations de classe II : elles communiquent ou ont communiqué avec un site anatomique colonisé par une flore commensale susceptible de contaminer les prélèvements (prélèvements d'origine digestive, suppurations fistulisées, etc.).

Les liquides d'épanchement (ascite, péricardique, péritonéal, pleural, etc.) résultent de la présence d'une quantité anormale de liquide dans les séreuses. Il existe deux types d'épanchement : non inflammatoire (transsudat paucicellulaire) et inflammatoire (exsudat riche en polynucléaires neutrophiles). Une origine septique est associée à la présence d'un épanchement inflammatoire, mais l'inverse n'est pas vrai. Les suppurations des séreuses surviennent au cours d'un processus infectieux et peuvent atteindre toutes les séreuses.

Prélèvements

Les prélèvements doivent être réalisés après asepsie rigoureuse afin d'éviter la contamination de l'échantillon et, de préférence, avant toute antibiothérapie. Ils doivent arriver au laboratoire dans un sac hermétique, accompagnés d'une feuille de renseignements cliniques. Les informations cliniques sont essentielles pour la suite de l'examen (nature de l'échantillon, modalités de prélèvement, contexte clinique et traitement antibiotique éventuel). La demande de recherches particulières (mycobactéries, mycoplasmes, gonocoque, *Chlamydia*, *Nocardia*, etc.) doit être mentionnée.

Nature des prélèvements

Prélèvements liquides (liquides de ponction et prélèvements peropératoires)

La ponction est faite à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue, après préparation soigneuse. Il est nécessaire de chasser l'air pour permettre la survie des anaérobies. Un ensemencement direct au lit du malade dans des flacons d'hémoculture (aérobie et anaérobie) est recommandé afin d'améliorer la sensibilité du diagnostic, mais une partie de l'échantillon doit être acheminée au laboratoire en parallèle pour la cytologie et l'examen direct.

Prélèvements solides (prélèvements peropératoires et biopsies)

Les fragments tissulaires de volume important sont acheminés dans des flacons stériles, sans conservateur et sans liquide. Les petits échantillons sont déposés au fond d'un tube stérile avec 3 à 4 gouttes de sérum physiologique stérile afin d'éviter la dessiccation.

Transport des prélèvements

Le délai maximal de transport est de 2 heures afin d'optimiser la survie des bactéries fragiles (anaérobies). Si ce délai doit être dépassé, il est recommandé de mettre les prélèvements dans un milieu de transport.

Diagnostic bactériologique

Le plus souvent, ces prélèvements ne peuvent pas être répétés. Ils sont donc particulièrement précieux et doivent faire l'objet d'une attention particulière. Il est important d'éviter leur contamination au laboratoire. Leur prise en charge doit être effectuée sous poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II.

Objectifs de l'analyse bactériologique selon le type de prélèvement

La localisation des suppurations profondes est très variable et les espèces bactériennes impliquées sont par conséquent très diverses. Deux types de prélèvements peuvent être analysés :

- suppurations de classe I et liquides d'épanchement et des séreuses : si les prélèvements sont effectués dans de bonnes conditions d'asepsie, les échantillons ont une faible probabilité de contenir des bactéries non impliquées dans l'infection. Les bactéries isolées sont directement en cause dans le processus infectieux et seront donc étudiées ;
- suppurations de classe II : les échantillons peuvent contenir des bactéries non impliquées dans l'infection. Toutes les bactéries isolées ne sont pas en cause dans le processus infectieux. L'analyse bactériologique tente d'imputer un lien causal entre une ou des bactérie(s) au sein de la flore commensale isolée et la constitution de la suppuration.

Examen macroscopique du prélèvement

Pour les liquides, l'aspect du prélèvement est important à noter (clair, trouble, hémorragique, purulent, etc.).

Traitement des prélèvements solides

Les prélèvements peropératoires et les biopsies doivent être broyés stérilement (tube à billes).

Examen microscopique du prélèvement

Cet examen a pour but de mettre en évidence les cellules (le plus souvent les hématies et les leucocytes) et les bactéries éventuellement présentes dans le prélèvement.

Cytologie

Pour les prélèvements liquides, en l'absence de coagulum ou de purulence, une analyse cytologique en cellule de Malassez est effectuée pour numérer les éléments nucléés et les hématies (par mm^3). En présence de leucocytes, une formule leucocytaire est réalisée après cytocentrifugation et coloration de May-Grünwald-Giemsa. La formule précise le type de cellules observées dans l'échantillon (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes, autres cellules, etc.). L'aspect et la cytologie du prélèvement permettent une orientation diagnostique, notamment pour les liquides pleuraux (Tableau 19.1).

Pour les prélèvements solides, la coloration de Gram sur un frottis du prélèvement (voir « Examen direct » ci-dessous) permet une évaluation semi-quantitative des polynucléaires neutrophiles, des hématies et des autres cellules.

Examen direct

Une coloration de Gram est effectuée sur un frottis du prélèvement, après cytocentrifugation en cas de prélèvement liquide en quantité suffisante. Cette étape est très importante car elle peut permettre une orientation diagnostique présomptive avec une instauration rapide d'une antibiothérapie probabiliste. Pour les prélèvements contaminés par une flore polymorphe commensale, l'abondance de la flore est évaluée. En cas de suspicion de mycobactéries, une coloration spécifique est mise en œuvre (auramine, Ziehl-Neelsen).

Mise en culture des prélèvements

Du fait de la diversité des bactéries isolées, des milieux de culture enrichis sont nécessaires, ainsi que des milieux sélectifs, notamment pour les prélèvements contaminés par une flore commensale.

Sont ensemencés au minimum :

- une gélose au sang incubée en aérobiose ;
- une gélose au sang cuit avec supplément polyvitaminique incubée sous CO_2 ;
- une gélose au sang incubée en anaérobiose ;
- un milieu liquide permettant la recherche d'anaérobies (Schaedler, cœur-cervelle, etc.).

Tableau 19.1 **Principaux résultats biologiques obtenus après analyse des liquides pleuraux (d'après [2]).**

Aspect	Clair citrin	Clair citrin	Louche	Purulent	Hémorragique
Cellules/mm^3	<500	>500	>500	>2000	Non réalisé
Neutrophiles	±	±	++	+++	±
Lymphocytes	±	+++	±	±	±
Examen direct	–	–	–	+	±
Culture	–	BK	±	+	±
Protéines (g/l)	<30	>30	>30	>50	>30
Interprétation	Transsudat	Exsudat Tuberculose	Exsudat Pleurésie parapneumonique (réaction pleurale secondaire à une infection pulmonaire)	Exsudat Pleurésie infectieuse (pneumocoque, staphylocoque, entérobactérie, anaérobie, etc.)	Exsudat

Peuvent être ajoutés :

- une gélose au sang + ANC incubée sous CO_2 pour les bactéries à Gram positif ;
- une gélose ordinaire incubée en aérobiose pour les bactéries à Gram négatif (CLED, BCP, etc.) ;
- des flacons d'hémoculture (aérobie et anaérobie) pouvant être ensemencés au laboratoire avec les prélèvements liquides si cela n'a pas déjà été fait au moment du prélèvement ;
- des recherches particulières (mycobactéries) selon le contexte clinique (Tableau 19.2).

Les milieux de culture sont incubés à 35 à 37 °C pendant au moins 5 jours (bactéries anaérobies ou de croissance lente). Le contrôle des cultures est effectué quotidiennement dans les premiers jours. Afin d'éviter la contamination des géloses, les cultures peuvent être effectuées en double. Ainsi, des géloses fermées par un adhésif ou un film étirable ou placées en jarres sont conservées en atmosphère humide sans manipulation jusqu'au terme de la culture. Pour les milieux liquides, l'incubation doit être poursuivie au minimum 15 jours.

Conservation des prélèvements pour analyse ultérieure

Ces prélèvements sont précieux et sont susceptibles de faire l'objet de recherches non évoquées au moment de leur réception en fonction de l'évolution clinique et des premiers résultats bactériologiques (recherches particulières, biologie moléculaire, etc.). Ils doivent donc être conservés au réfrigérateur ou au congélateur pour analyse(s) ultérieure(s) éventuelle(s).

Interprétation des cultures positives

Étant donné la diversité des localisations, tout prélèvement doit être correctement identifié avec la localisation précise et des renseignements cliniques indispensables pour aider le bactériologiste dans sa démarche diagnostique. L'interprétation varie selon la localisation anatomique (Tableaux 19.3 et 19.4) et le type de prélèvement :

- suppurations de classe I et liquides d'épanchement et des séreuses : toute bactérie isolée est considérée comme potentiellement pathogène et fait l'objet d'une identification et d'un antibiogramme. L'interprétation peut être délicate quand il s'agit d'une espèce commensale de la peau (staphylocoque à coagulase négative, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, etc.), qui peut être un contaminant du prélèvement. Dans ce cas, l'isolement à plusieurs reprises de la même souche bactérienne (sur plusieurs milieux ou à partir de plusieurs prélèvements) ainsi que son abondance sur les milieux de culture permettent d'aider à décider de la prise en compte ou non

Tableau 19.2 **Recherches de bactéries particulières à réaliser selon le contexte clinique et le prélèvement.**

Prélèvement	Recherches particulières
Abcès cérébral	*Actinomyces*, mycobactéries, *Mycoplasma*, *Nocardia*, *Rhodococcus equi*
Adénopathie	*Bartonella*, *Francisella*, mycobactéries, syphilis, *Brucella*, *Tropheryma whipplei*
Lésion granulomateuse	*Bartonella*, mycobactéries, *Nocardia*
Épanchement péricardique	Mycobactéries, *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Leptospira*, *Chlamydophila*, *Legionella*, *Rhodococcus equi*, *Rickettsia*, *Coxiella*, *Bartonella*, *Tropheryma whipplei*

Tableau 19.3 **Principales bactéries isolées en fonction des différents types d'épanchements (d'après [2]).**

Tableau clinique	Principales bactéries en cause
Pleurésies infectieuses	– Mycobactéries – *Streptococcus pneumoniae* et autres streptocoques – *Staphylococcus aureus* et autres staphylocoques – Bacilles à Gram négatif (entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*) – Anaérobies (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, etc.) – Plus rarement : *Actinomyces*, *Nocardia*, bactéries atypiques (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*)
Infections abdominales	– Entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, etc.) – Anaérobies (*Bacteroides*, *Clostridium*, etc.) – Entérocoques (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, etc.)
Péricardites	– *Streptococcus pneumoniae* – *Staphylococcus aureus* – Mycobactéries – Plus rarement : entérobactéries (*Salmonella*, etc.), *Neisseria*, *Haemophilus*

Tableau 19.4 **Principaux micro-organismes responsables des péritonites et des abcès hépatiques (d'après [1]).**

Tableau clinique	Principaux microorganismes en cause
Péritonites primitives	– Adulte : *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella* spp., anaérobies – Enfant : *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*
Péritonites secondaires	– Anaérobies (*Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Bilophila wadsworthia*, etc.) – Entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, etc.) – Streptocoques et entérocoques – *Pseudomonas aeruginosa* – *Candida*
Abcès hépatiques	– Entérobactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, etc.) – Streptocoques et entérocoques – *Staphylococcus aureus* – *Entamoeba histolytica*

de cette espèce dans la prise en charge thérapeutique du patient. L'interprétation repose aussi sur la cytologie, l'examen direct et les constatations cliniques;
- suppurations de classe II : si plus de trois espèces bactériennes sont isolées, la pertinence de l'identification et de l'antibiogramme systématique est faible. En effet, il s'agit soit d'une infection polymicrobienne impliquant une flore mixte avec des bactéries anaérobies difficiles à cultiver, soit de la présence, au niveau du foyer infectieux et du prélèvement, de bactéries commensales du fait d'une communication avec un site colonisé par une flore commensale (perforation, fistule, etc.).

Étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques

Selon les critères d'interprétation évoqués ci-dessus, un antibiogramme doit être réalisé sur toutes les souches qui peuvent être responsables d'un processus infectieux. Si une même espèce bactérienne est isolée chez un patient à partir de plusieurs prélèvements, il est recommandé de faire plusieurs antibiogrammes afin de pouvoir les comparer. L'antibiogramme est réalisé selon les recommandations du CA-SFM. Il peut être nécessaire de faire des concentrations minimales inhibitrices (CMI), par exemple à l'aide d'E-test® (bandelettes à gradient de concentration d'antibiotique).

Conservation des souches isolées

Il est impératif de conserver les souches bactériennes des prélèvements profonds, idéalement par congélation en présence d'un cryoprotecteur comme le glycérol et à une température de –20 °C à –80 °C.

Diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire est complémentaire de la culture; il ne permet pas l'obtention d'un antibiogramme. Il intervient souvent dans un second temps au cours du diagnostic biologique. Cependant, la recherche de gènes bactériens par PCR à partir des prélèvements biologiques peut être très utile, notamment en cas de traitement antibiotique au moment du prélèvement ou de bactéries de croissance difficile ou lente (*Bartonella*, *Francisella tularensis*, etc.). Deux types de cibles génomiques peuvent être recherchés : spécifiques (amorces spécifiques d'espèce) ou universels (amorces universelles permettant d'amplifier le gène ou plus souvent une partie du gène de l'ARN ribosomique 16S). Quand cela est possible, il est préférable de privilégier une PCR spécifique d'espèce en raison d'une meilleure sensibilité.

Conclusion

La qualité des résultats du diagnostic bactériologique des suppurations profondes repose avant tout sur la qualité des prélèvements réalisés ainsi que sur les renseignements cliniques indispensables qui doivent les accompagner. L'interprétation des cultures positives et la mise en œuvre de techniques de diagnostic complémentaires (diagnostic moléculaire) nécessitent une bonne collaboration entre biologiste et clinicien pour une meilleure prise en charge des patients.

Références

[1] Ploy MC, Denis F. Analyse cytobactériologique des pus. In : Denis F, Ploy MC, Martin C, et al., editors. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson; 2007. p. 165–70.

[2] Ploy MC, Martin C. Liquides de ponction. In : Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E, Quentin R, editors. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Issy-les-Moulineaux. Elsevier Masson; 2007. p. 175–9.

Pour en savoir plus

Société Française de Microbiologie. Examen bactériologique des collections closes et des séreuses. In : REMIC, editors. Société Française de Microbiologie; 2015. p. 277–84.

Chapitre 20

Infections ostéoarticulaires

C. Isnard, V. Cattoir, F. Guérin

PLAN DU CHAPITRE

Introduction

Les infections ostéoarticulaires (IOA) regroupent plusieurs entités cliniques ayant en commun l'invasion et la destruction du tissu osseux ou cartilagineux par un micro-organisme bactérien. Les IOA correspondent donc à un groupe très hétérogène de présentations cliniques, classées selon la localisation anatomique du tissu endommagé, le délai d'évolution, le mécanisme d'infection et la présence ou non de matériel. Les différentes entités cliniques correspondant aux IOA sont :

- l'arthrite, l'ostéomyélite et l'ostéite ;
- la spondylodiscite (infection discovertébrale) ;
- l'infection sur matériel/prothèse ;
- l'infection du pied diabétique.

Pour ces quatre entités cliniques, il est indispensable de caractériser si l'atteinte est chronique ou aiguë. En effet, de cette caractérisation découlera la prise en charge médico-chirurgicale. De plus, l'écologie bactérienne est fortement influencée par ces aspects.

Un élément essentiel au diagnostic pour la mise en œuvre de techniques adaptées repose sur une anamnèse bien menée.

L'IOA est observée plus fréquemment chez les patients de sexe masculin (sex ratio : 1,5), d'âge moyen légèrement supérieur à 60 ans avec des facteurs de risque : tabagisme, surcharge pondérale, antécédents chirurgicaux, foyers infectieux associés (infection cutanée, dentaire, urinaire ou digestive, abcès, etc.) ou comorbidités dans 50 % des cas (diabète, polyarthrite rhumatoïde, drépanocytose, immunodépression, etc.). Sa fréquence est rare ; cependant, sa guérison clinique est difficile à obtenir. En France, environ 2000 à 2500 cas d'IOA sont répertoriées par an, soit une incidence de 54,6 pour 100 000 habitants environ avec un taux de mortalité proche de 5 % et des séquelles fonctionnelles dans environ 30 à 40 % des cas selon la localisation.

Elle peut survenir spontanément, par exemple dans le cadre d'une septicémie (arthrite septique), d'une continuité avec une plaie profonde, dans les suites d'une fracture ouverte ou après un geste chirurgical avec ou sans mise en place de matériel (prothèse, broche, clou, plaque, vis, etc.).

Le traitement de l'IOA est difficile car les antibiotiques diffusent faiblement dans les os et les articulations. De plus, en présence de matériel chirurgical, les bactéries se fixent sur ces matériaux en formant des biofilms qui réduisent l'activité des antibiotiques. Le traitement des IOA requiert de façon quasi systématique l'association d'un traitement antibiotique à un traitement chirurgical.

N.B. : Les infections du pied diabétique, constituant une entité clinique à part, sont abordées dans le chapitre 18.2.

Définitions

Durée d'évolution : aiguë < 1 mois ; chronique > 1 mois.
IOA complexe (IOAC) : groupe d'infections recouvrant essentiellement les infections sur prothèse ou sur matériel d'ostéosynthèse et les infections post-traumatiques (fractures ouvertes).
Ostéite : terme générique regroupant les infections osseuses post-traumatiques et postopératoires, d'expression précoce ou tardive.
Ostéoarthrite : arthrite septique avec atteinte osseuse sous-jacente.
Ostéomyélite : infection osseuse hématogène.
Séquestre osseux : dénominateur évolutif commun.

Physiopathologie des IOA

En général, la contamination osseuse et/ou articulaire par des micro-organismes se fait selon trois modalités :

- contamination hématogène à partir d'un foyer infectieux : cause de contamination la plus fréquente ;
- inoculation directe : soit post-traumatique (fracture ouverte, morsure, etc.), soit postchirurgicale associée à une infection contiguë (plaie, hématome infecté, escarre), à une insuffisance artérielle (diabète, artérite des membres inférieurs) ou à l'existence d'une neuropathie ;

- contamination sur du matériel étranger (prothèses, fixateurs externes).

Le tissu osseux présente une particularité importante sur le plan physiopathologique concernant sa vascularisation. En effet, les artères nutritives de l'os se terminent en capillaires artériels qui eux-mêmes vont aboutir dans le réseau veineux sinusoïde. Cette organisation anatomique a pour conséquence que toute obstruction des capillaires terminaux provoquera l'apparition rapide d'une nécrose osseuse. Cette obstruction peut être de diverses origines comme les traumatismes, mais aussi une insuffisance circulatoire liée à des pathologies telles que les artérites ou le diabète, ou le tabagisme actif. En cas de nécrose osseuse, le tissu devient une zone propice à la multiplication bactérienne. En cas de développement bactérien, un afflux de cellules pro-inflammatoires libérera de nombreuses substances protéolytiques ou encore des enzymes, ce qui aura pour conséquence de détruire encore plus la zone osseuse infectée. On parle alors d'une zone osseuse nécrosée ou séquestre osseux. La coexistence d'une zone mal vascularisée, d'une réaction inflammatoire inefficace et de tissus infectés nécrosés conduit à l'apparition d'une infection chronique. L'ostéomyélite est un processus infectieux qui englobe tous les composants osseux, y compris la moelle osseuse avec présence de bactéries intracellulaires au niveau des structures périostées mais aussi endostées. Les bactéries sont alors « séquestrées » dans les cellules, formant la structure osseuse comme les ostéoblastes, les ostéoclastes ou les cellules endothéliales. Cette internalisation cellulaire permet aux bactéries d'échapper au processus inflammatoire et aux cellules phagocytaires d'envahir d'autres cellules osseuses. Les bactéries protégées par les cellules hôtes peuvent également échapper aux traitements antibiotiques.

Concernant la physiopathologie de l'arthrite septique (urgence médicale), la voie hématogène est souvent en cause, lors d'une bactériémie occulte ou symptomatique (par exemple endocardite). L'inoculation peut être directe, accidentelle lors d'une blessure ou iatrogène. Les bactéries peuvent également se propager dans l'articulation par contiguïté comme lors d'une ostéomyélite ou d'une infection des tissus mous. L'arthrite septique correspond à une infection de la cavité articulaire. La bactérie adhère d'abord à la membrane synoviale, se multiplie dans le liquide synovial et y produit une réaction inflammatoire entraînant une dégradation du cartilage, une nécrose des chondrocytes évoluant jusqu'à la nécrose et la destruction de la fonction articulaire.

Les mécanismes d'infections sur prothèse font intervenir d'autres propriétés bactériennes dont les conséquences sur la prise en charge du patient sont importantes : adhésion bactérienne irréversible en 4 à 8 heures, agrégation et stratification bactérienne par production d'exopolysaccharides (glycocalix ou *slime*). Des formes quiescentes, fixes et adhérentes sont ainsi retrouvées dans les couches profondes. Les bactéries dites superficielles pourront par conséquent se libérer à tout moment et créer des emboles septiques. On parle alors de biofilm bactérien. Toutes ces propriétés contribuent à créer une communauté bactérienne avec un mode de survie adapté aux conditions (ralentissement du métabolisme, imperméabilité aux anticorps et aux phagocytes) et une perte d'efficacité des antibiotiques (diminution de la diffusion au sein du biofilm, augmentation de la résistance bactérienne).

Germes fréquemment impliqués dans les IOA

Les espèces les plus fréquemment impliquées dans les IOA varient selon les différentes localisations anatomiques et en fonction de l'âge des individus (Tableau 20.1). Un autre paramètre important dans la recherche de germes impliqués dans les IOA est le terrain : toxicomanie, contact avec un animal, ingestion de produits laitiers crus, diabète, artérite, drépanocytose, iatrogénie (infiltration, prothèse, cathéter, hémodialyse, etc.).

Staphylococcus aureus est l'agent pathogène le plus fréquemment isolés dans les IOA natives (35 à 65 % des cas selon les études). Ce germe ubiquitaire et commensal produit de nombreux facteurs de virulence comme les hémolysines, des toxines (par exemple toxine de Panton-Valentine [PVL]), des substances polysaccharidiques (entrant dans la constitution d'un *slime*, première étape dans la formation de biofilm bactérien), des adhésines contribuant à la localisation osseuse (protéine liant la fibronectine, *clumping factor*, protéine liant le glycogène, protéine A, etc.), ce qui augmente le risque de greffe septique ostéoarticulaire (30 à 40 % des cas) en comparaison avec les autres agents étiologiques (< 1 %).

Arthrites septiques

Les arthrites septiques sont divisées en deux entités : gonococciques ou non.

Neisseria gonorrheae reste l'agent pathogène le plus fréquemment isolé (75 % des cas) chez la personne jeune sexuellement active. Cela étant, son incidence en Europe a diminué de façon significative.

Au cours des méningites cérébrospinales, l'observation d'arthrites septiques à *N. meningitidis* n'est pas exceptionnelle.

À noter que l'agent étiologique bactérien le plus souvent rencontré dans les arthrites septiques tous âges confondus est *S. aureus*.

Infections sur prothèse

Les agents étiologiques les plus fréquemment rencontrés sont les *Staphylococcus* spp., retrouvés dans près de 50 % des cas (Tableau 20.2).

Spondylodiscites

Dans les spondylodiscites primitives ou hématogènes comme dans les autres IOA, *S. aureus* est l'espèce la plus fréquemment isolée, suivie des streptocoques, des staphylocoques à coagulase négative (SCN), des entérobactéries, de *P. aeruginosa* et des entérocoques (Tableau 20.3).

En plus des espèces bactériennes habituellement isolées, la fréquence des spondylodiscites à *Mycobacterium tuberculosis* varie considérablement selon le niveau d'endémie, allant de 20 à 40 % en Europe, jusqu'à plus de 70 % en Afrique du nord.

Diagnostic microbiologique des IOA

La sensibilité et la spécificité de la culture des prélèvements sont respectivement de 80 et 93 % selon la définition d'une IOA, soulignant l'importance de critères diagnostiques consensuels. Une

Tableau 20.1 **Principaux germes isolés en fonction du type d'infection ostéoarticulaire et de l'âge du patient.**

		Nouveau-né	Enfant	Adulte	Contexte
Arthrite aiguë	*S. aureus*	+++	+++	+++	
	Neisseria gonorrhoeae			+	Adulte < 30 ans
	Entérobactéries	+++		+	
	Streptococcus pyogenes		+++	++	
	Streptococcus agalactiae	+++		+	
	Pseudomonas aeruginosa		++	+	
	Streptococcus pneumoniae		+	+	
	Haemophilus spp.		+		Enfant < 3 ans Drépanocytose
	Kingella kingae		+++		
	Pasteurella multocida Capnocytophaga canimorsus				Morsure animale
Ostéomyélite aiguë	*S. aureus*	+++	+++	+++	
	S. pyogenes		+++	++	
	H. influenzae		+		Enfant < 5 ans
	Salmonella spp.		++	+	
Ostéite et ostéoarthrite post-traumatique	*S. aureus*	+++	+++	+++	
	Entérobactéries	+	+	+	
	Pseudomonas aeruginosa	+	+	+	
Spondylodiscite aiguë	*S. aureus*			+++	
	Escherichia coli			++	
	Entérobactéries			++	
	Streptococcus spp.			++	Endocardite souvent associée
	Brucella melitensis				Contact avec animal, ingestion produits laitiers crus
Spondylodiscite chronique	*Mycobacterium tuberculosis*				

antibiothérapie préalable, des bactéries de croissance fastidieuse ou structurées en biofilm, des micro-organismes ne se cultivant pas sur les milieux usuels, la mort des bactéries à cause de mauvaises conditions de transport ou de l'antibiothérapie locale libérée lors du retrait de l'implant peuvent être à l'origine de cultures faussement négatives. Le recours à d'autres techniques comme la biologie moléculaire peut ainsi être nécessaire.

Prélèvements

Prélèvements superficiels

La valeur diagnostique des échantillons de cicatrices désunies, suintantes sur écouvillon est discutable. Ce type de prélèvement est donc à proscrire dans le diagnostic des IOA.

Prélèvements profonds au niveau du site infectieux

Il s'agit de prélèvements précieux dont la valeur diagnostique est indiscutable. Les prélèvements doivent être réalisés en l'absence d'antibiothérapie (fenêtre thérapeutique de 15 jours en cas d'IOA chronique) et après une décontamination cutanée soigneuse.

Les différents prélèvements effectués peuvent être des : liquides de ponction articulaire (ou de lavages) ; ponctions d'abcès sous-périosté ou médullaires ; biopsies osseuses, synoviales ou discovertébrales ; prélèvements peropératoires (tissus nécrotique, capsule, os, etc.) ou de matériel (vis, ciment, etc.).

Dans les infections sur prothèse, il est fortement recommandé de réaliser 5 prélèvements, afin de distinguer les

Tableau 20.2 **Répartition globale (%) des espèces bactériennes isolées au cours des infections sur prothèse.**

Micro-organismes	Fréquence (%)	Catégorie d'infection
Staphylocoque à coagulase négative	30–43 %	Précoce Chronique tardive
Staphylococcus aureus	12–23 %	Précoce Chronique tardive Hématogène
Infection polymicrobienne	10–36 %	
Bacilles à Gram négatif	3–6 %	Hématogène
Streptocoques	9–10 %	Hématogène
Anaérobies (*Propionibacterium acnes* ++)	2–4 %	Chronique tardive (prothèse d'épaule ++)
Entérocoques	3–7 %	Hématogène
Autres	10 %	

Tableau 20.3 **Répartition globale (%) des espèces bactériennes isolées dans les spondylodiscites non tuberculeuses.**

Micro-organismes	Répartition
Staphylococcus aureus	51 %
Bacilles à Gram négatif	24 %
Streptocoques	10 %
Staphylocoques à coagulase négative	7 %
Infection polymicrobienne	8 %

bactéries pathogènes des contaminants. Un nombre plus important de prélèvements n'améliore pas les performances de l'examen ; cependant, il engendre une probabilité accrue de contamination, une surcharge de travail pour le laboratoire ainsi que des coûts supplémentaires injustifiés.

Transport et stockage des prélèvements

Les prélèvements doivent être remis au laboratoire dans des récipients stériles, adaptés (seringue sans aiguille et closes ou tubes secs stériles ou flacons stériles) et acheminés rapidement au laboratoire (<2 heures à température ambiante). En cas d'impossibilité, la mise en place de milieux de transport pour la recherche de germes exigeants est fortement recommandée.

Pour les liquides articulaires, il est fortement recommandé d'injecter le liquide dans un tube contenant de l'héparine pour la numération des éléments. En cas de réalisation d'un examen de biologie moléculaire, l'utilisation de tube EDTA est préconisée. En parallèle de ces conditionnements, il est possible d'ensemencer des flacons d'hémocultures avec les liquides de ponction.

Pour les prélèvements tissulaires, des flacons stériles secs ou avec milieux de transport peuvent être utilisés.

Les prélèvements doivent être accompagnés d'une fiche de renseignements comportant au minimum les renseignements suivants (en plus des obligations normatives colligées dans la norme ISO EN 15189) : localisation précise de la ponction, existence d'une antibiothérapie, antécédents concernant le site d'infection, etc. Ces informations sont indispensables pour l'interprétation des résultats et l'instauration de recherches spécifiques.

N.B. : En parallèle des prélèvements de la localisation potentiellement infectée, la réalisation de prélèvements annexes peut conforter le diagnostic et/ou déterminer la porte d'entrée de l'IOA : hémocultures, ECBU, prélèvement de gorge, de plaie ou génital, etc.

Traitement de l'échantillon

Au laboratoire, les prélèvements (liquides ou solides) doivent être systématiquement manipulés avec précaution, sous conditions strictes de stérilité en poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II pour éviter toute contamination et avec du matériel à usage unique.

En l'absence d'épanchement, le prétraitement des échantillons tissulaires ou de prothèse est fondé sur le broyage des prélèvements et/ou la sonication des matériels explantés. L'objectif est de libérer les bactéries incluses dans le biofilm qui adhèrent fortement au matériel. Le broyage peut être réalisé à l'aide de dispositifs stériles vendus dans le commerce (par exemple Ultra-Turrax®, Fig. 20.1) ou de billes de verre stérilisées ou de mortiers stérilisés. La sonication des implants est réalisée dans un bain à ultrasons avec un support scellé contenant le liquide de sonication et l'implant retiré. L'application d'ultrasons à basse fréquence permet de détacher le biofilm de la surface et de le casser sans altérer la viabilité des bactéries.

Examen direct

L'examen direct d'un frottis après coloration de Gram permet de rechercher la présence de polynucléaires neutrophiles (PNN) et de bactéries. Cet examen réalisé à partir du liquide synovial et des prélèvements solides montre une faible sensibilité (environ 10 %) alors que la spécificité est proche de 100 %.

La numération des éléments des liquides (articulaire ou d'épanchement) peut permettre une orientation diagnostique des IOA. Pour les liquides articulaires sans prothèse, le nombre de leucocytes est normalement inférieur à 1000/mm^3. En cas d'augmentation de ce nombre, à côté d'une infection, il existe de nombreuses autres étiologies : arthrite microcristalline, inflammatoire, traumatique ou mécanique.

Concernant les IOA avec prothèse, le seuil de significativité de la valeur de la numération leucocytaire varie de 1700 à plus de 5000/mm^3. La détermination précise des leucocytes a une valeur uniquement d'orientation. Ainsi, l'évaluation semi-quantitative de la présence (absence, rares, quelques et nombreux) est suffisante.





Fig. 20.1 Exemple de broyeur-homogénéiseur Ultra-Turrax® (A) de paillasse avec un tube à billes métalliques, (B) adapté pour les prélèvements solides ou de matériel étranger explanté (exemple vis).

Mise en culture

L'ensemencement de deux géloses au sang (l'une incubée en aérobiose et l'autre en anaérobiose), d'une gélose au sang cuit incubée sous 5 % de CO_2 et d'un milieu liquide de type bouillon Schaedler est nécessaire à la recherche des différents pathogènes pouvant être responsables d'IOA. Des flacons d'hémocultures peuvent également être ensemencés.

Une incubation pendant 14 jours à 35 °C permettra l'isolement de variants métaboliques cultivant sous forme de microcolonies (appelés *small colony variant* [SCV]), de bactéries de croissance lente (par exemple *Propionibacterium acnes*) et d'infections polymicrobiennes. La prolongation des cultures à 14 jours permet d'augmenter la sensibilité de la culture, notamment en cas d'IOA sur prothèse tardive.

Conservation des échantillons

Il est également important de conserver une partie de chaque prélèvement à −80 °C pour d'éventuelles analyses complémentaires (par exemple biologie moléculaire, recherche de mycobactéries).

Lecture des cultures

La lecture des géloses doit être réalisée à J1, J2 et J5 (et J10 pour la gélose anaérobie) avec une lecture régulière des milieux liquides jusqu'à J14. Ces derniers seront systématiquement repiqués dès qu'un trouble apparaît ou à J14, même s'ils ne sont pas troubles (certaines bactéries pouvant ne pas troubler le bouillon d'enrichissement). La lecture des géloses doit être attentive à la recherche des différents aspects de colonies et notamment des SCV (Fig. 20.2). Une culture positive précoce ne dispense pas des lectures suivantes et d'une incubation complète à la recherche de bactéries à croissance plus lente, les infections polymicrobiennes représentant en moyenne 23 % des IOA sur prothèse.

Une identification et un antibiogramme doivent être réalisés sur les différents types de colonies isolées. À noter que l'identification biochimique peut être mise en défaut pour

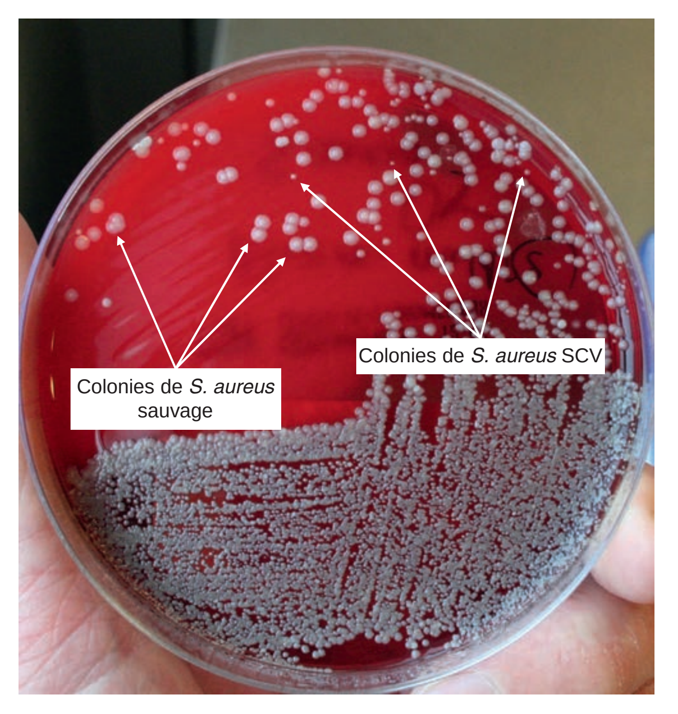


Fig. 20.2 Différents aspects de colonies de *Staphylococcus aureus* isolées d'un prélèvement ostéoarticulaire sur gélose au sang frais (5 %) après 48 heures d'incubation à 35 °C en aérobiose. SCV : *small colony variant. (Photographie : Michel Auzou.)*

certaines souches de SCV et de bactéries anaérobies, mais que la spectrométrie de masse MALDI-TOF est très fiable. Dans certains cas, l'identification moléculaire (séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S ou des gènes *sodA* ou *rpoB*) est nécessaire, mais cette technique est généralement réalisée par des laboratoires spécialisés.

Interprétation

Pour les infections aiguës, l'interprétation des résultats ne pose habituellement pas de problème, sauf si le patient est

sous antibiotique au moment des prélèvements. Dans ce cas, les techniques de biologie moléculaire constituent une bonne alternative. En général, les cultures se positivent rapidement et les bactéries en cause n'entraînent pas de problème d'identification et d'antibiogramme.

Inversement, le diagnostic en cas d'infections chroniques est souvent tardif et plus complexe. Les germes impliqués étant en petite quantité et ayant le plus souvent une croissance ralentie, une morphologie atypique et des caractères biochimiques inhabituels, le risque d'erreur d'identification et d'interprétation est plus important. Les colonies d'une même espèce/souche peuvent présenter des aspects polymorphes en culture, avec parfois des antibiogrammes différents faisant évoquer une contamination. Dans ce cas, il est souhaitable de réaliser un génotypage afin de confirmer la clonalité des souches. De plus, il est parfois difficile de conclure entre le rôle pathogène ou contaminant des bactéries appartenant à la flore cutanée (notamment SCN), fréquemment isolées dans les IOA chroniques.

L'interprétation des résultats bactériologiques doit tenir compte également des données clinicobiologiques, des espèces identifiées, de la nature et du nombre de prélèvements positifs, et également pour ces derniers du nombre de milieux positifs et de colonies observées. Les conclusions reposent sur l'étude de plusieurs prélèvements profonds. Ainsi, la probabilité d'infection augmente avec le nombre de prélèvements positifs en culture avec la même bactérie. Du fait de la sensibilité de la culture, la négativité des prélèvements n'exclut pas le diagnostic d'IOA. Dans tous les cas, ce n'est qu'au terme d'une confrontation multidisciplinaire que le diagnostic final doit être retenu et la conduite à tenir décidée.

D'un point de vue microbiologique, l'IOA est certaine (Fig. 20.3) :

- isolement d'un germe pathogène, d'un commensal ou d'un saprophyte avec l'ensemble des éléments de l'analyse microbiologique en faveur d'une infection (examen direct et culture) ;
- pour les IOA sur prothèse :
  – présence d'au moins 3 prélèvements (3 prélèvements peropératoires, ou 2 prélèvements peropératoires et 1 prélèvement par ponction articulaire réalisée en préopératoire) ou 2 prélèvements espacés dans le temps (1 prélèvement peropératoire et 1 prélèvement par ponction articulaire) positifs à la même bactérie (même espèce avec même antibiogramme) appartenant à la flore cutanée (par exemple SCN, *P. acnes*, *Corynebacterium* spp.) et dont l'isolement pose la question d'une éventuelle contamination ;
  – présence d'au moins 1 prélèvement positif (1 prélèvement peropératoire ou 1 prélèvement par ponction articulaire ou par hémoculture) à une bactérie dont la

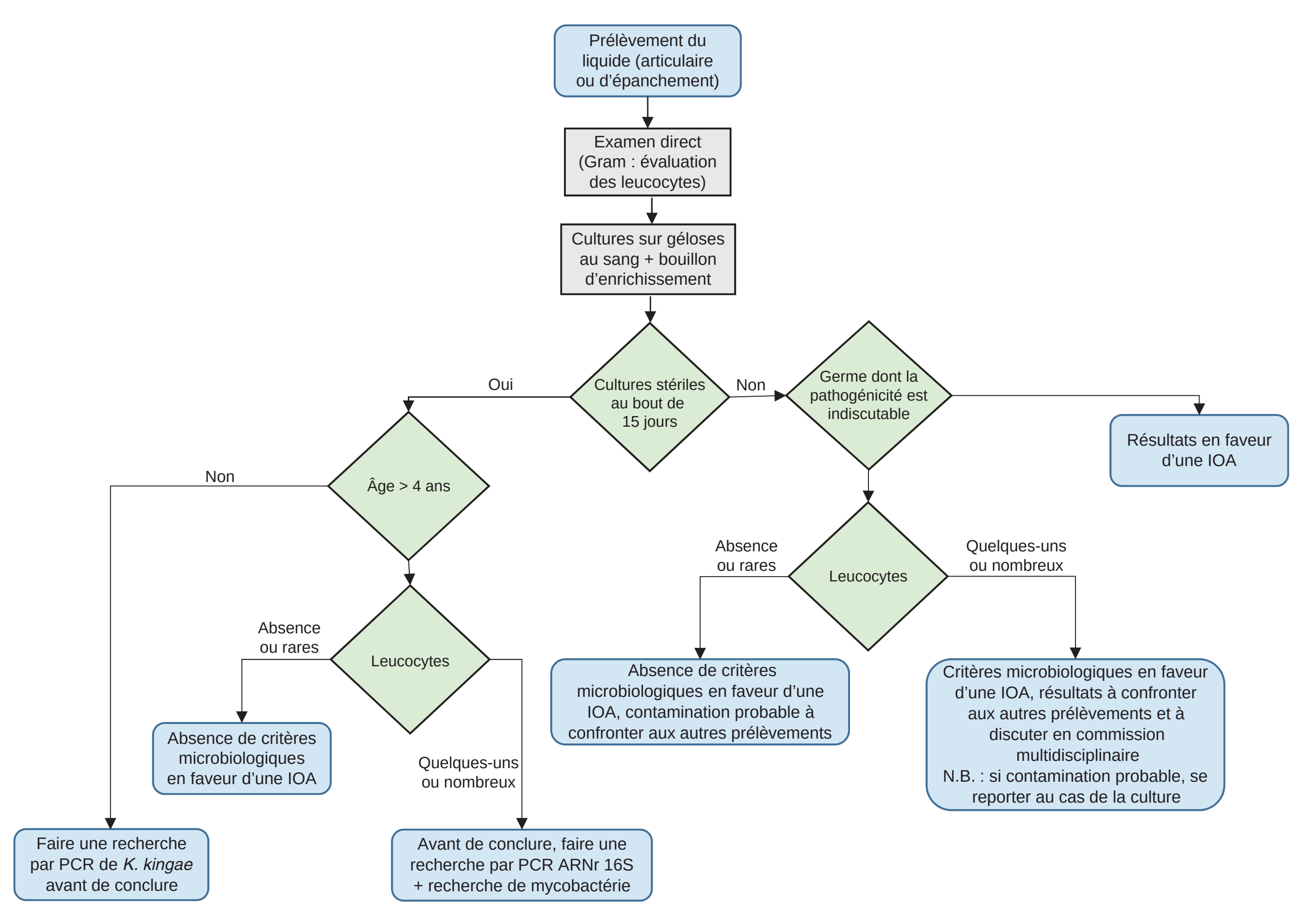


Fig. 20.3 Logigramme décisionnel pour l'analyse d'un liquide articulaire ou d'épanchement. IOA : infection ostéoarticulaire.

pathogénicité est indiscutable (par exemple *S. aureus*, entérobactéries, *P. aeruginosa*) ou avec une bactérie exceptionnellement rencontrée pour laquelle la question d'une contamination ne se pose pas (par exemple *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp.).

Une infection est probablement exclue ou non détectable si :

- tous les prélèvements de ponction sont stériles;
- tous les prélèvements peropératoires sont stériles (à condition d'avoir été réalisés après 15 jours d'arrêt de toute antibiothérapie) et lorsqu'il n'existe aucun signe histologique d'infection;
- un seul prélèvement peropératoire est positif à une bactérie de la flore cutanée (SCN, *P. acnes*, *Corynebacterium* spp., etc.) sans signe histologique d'infection et avec moins de 65 % de PNN dans le liquide de ponction articulaire.

Dans ces trois situations, une CRP < 10 mg/l peut conforter l'absence d'IOA.

Diagnostic moléculaire

L'approche moléculaire vise à mettre en évidence l'ADN bactérien lorsque la culture conventionnelle n'est pas contributive au diagnostic d'IOA. Plusieurs techniques moléculaires fondées sur la PCR existent. Les techniques moléculaires sont complémentaires à la culture qui reste la méthode de référence pour le diagnostic d'IOA. Le rendement de la PCR dans le diagnostic de ces infections est dans l'ensemble assez faible si celle-ci est étendue à l'ensemble des prélèvements. En revanche, son usage ciblé en deuxième intention chez des patients suspects d'IOA, dont les prélèvements sont restés stériles en culture, est beaucoup plus sensible. En effet, les techniques conventionnelles de culture sont mises à défaut par les bactéries ne se cultivant pas sur milieux usuels (par exemple bactéries intracellulaires, bactéries à croissance difficile comme *K. kingae*, mycobactéries), celles qui ont perdu leur capacité de croissance (par exemple antibiothérapie, conditions de transport inappropriées) et enfin celles dont la croissance est ralentie ou difficile (SCV). Les méthodes moléculaires, qui ne dépendent ni de la viabilité, ni du métabolisme de la bactérie, sont donc théoriquement capables de permettre le diagnostic dans ces situations. Ainsi, l'apport de ces techniques dans la prise en charge des IOA doit être évalué car il s'agit de pratiques réalisées en plus des approches classiques de culture et qui sont donc à l'origine de coûts et de temps technique supplémentaires. Il faut également souligner que la plupart des méthodes moléculaires restent du ressort de laboratoires spécialisés et qu'elles sont donc difficilement utilisables en routine. Le diagnostic moléculaire peut être réalisé à partir du liquide articulaire, des broyats et/ou du liquide de sonication, mais aussi à partir de souches bactériennes dont l'identification pose des difficultés par les techniques phénotypiques.

Deux types de PCR sont principalement utilisés.

PCR panbactérienne ou universelle

Pour la documentation microbiologique des IOA, la PCR universelle consiste à amplifier le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S bactérien, suivi d'un séquençage. Cette technique présente une sensibilité imparfaite et variable selon les espèces bactériennes (sensibilité inférieure à la PCR spécifique). Par conséquent, un résultat négatif n'exclut pas le diagnostic d'IOA. De plus, la PCR universelle n'est pas suffisamment fiable pour différencier certaines espèces phylogénétiquement très proches comme les streptocoques du groupe *mitis* et *S. pneumoniae*. Cette technique présente plusieurs inconvénients : délai d'obtention long (séquençage), contamination, avec le risque de rendre un résultat faussement positif, rendement de l'extraction à partir de prélèvements biologiques, impossibilité de conclure en cas d'infection polymicrobienne.

La sensibilité et la spécificité de cette technique pour le diagnostic des IOA varient selon les publications de 50 à 92 % et de 65 à 94 %, respectivement. À noter que la PCR universelle à partir du liquide de sonication semble améliorer les performances du test.

PCR spécifiques

La technique de PCR spécifique consiste à amplifier un gène spécifique d'une espèce (par exemple *S. aureus*) ou de résistance aux antibiotiques (par exemple *mecA*). Alors que les techniques de PCR classique peuvent toujours être utilisées, l'approche par PCR en temps réel a largement supplanté celles-ci. Les principaux avantages de la PCR en temps réel sont : rapidité (en général < 2 heures), meilleure sensibilité que la PCR classique, intérêt pour les germes à croissance difficile (par exemple *K. kingae*).

Parmi les systèmes les plus utilisés, on retrouve le kit Xpert MRSA/SA SSTI® (Cepheid, États-Unis). Cette technique de biologie moléculaire a été validée dans l'indication des IOA. Elle permet, grâce à un système de cartouches « tout en un », de détecter la présence de *S. aureus* ou de SCN, mais aussi de renseigner sur l'éventuelle résistance à la méticilline (gène *mecA*) du staphylocoque présent directement à partir du prélèvement. Ce kit permet donc d'apporter une réponse rapide (<2 heures), fiable et importante d'un point de vue thérapeutique. Cependant, une des limites de cette technique reste sont coût relativement élevé.

D'autres tests de biologie moléculaire « commerciaux » sont retrouvés sur le marché. Ces derniers, dans la grande majorité des cas, permettent de mettre en évidence la résistance à la méticilline de *S. aureus* isolé de prélèvements. C'est le cas par exemple du kit BD GeneOhm StaphSR® (Beckton Dickinson, États-Unis). Cependant, leur utilisation dans le contexte d'IOA n'a pas été validée par des études à ce jour.

Cas particulier de *K. kingae*

K. kingae, petit bacille à Gram négatif de croissance difficile, est un germe commensal de l'oropharynx. Le portage est variable en fonction de l'âge. La prévalence des infections articulaires liée à cette espèce est élevée, entre 6 mois et 4 ans (principale étiologie des IOA chez l'enfant). La recherche est réalisée par PCR avec des amorces spécifiques. Devant toute arthrite septique, la recherche chez l'enfant de cet agent pathogène doit être entreprise de façon systématique.

Conclusion

Le diagnostic d'IOA constitue un véritable défi pour le microbiologiste dans le choix des techniques à mettre en œuvre. Le diagnostic bactériologique est rendu délicat par la diversité et les caractéristiques des bactéries incriminées.

Dix à 50 % des IOA selon les séries et le contexte clinique restent non étiquetées du fait de mauvaises conditions pré-analytiques (délai de transport trop long, prélèvement mal réalisé, renseignements cliniques insuffisants pour mettre en œuvre des techniques adaptées, traitement de l'échantillon mal réalisé), de bactéries fragiles (par exemple *K. kingae*, anaérobies) ou encore de cultures inappropriées (par exemple recherche de mycobactéries).

Le diagnostic d'IOA doit reposer sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques. Les différents intervenants doivent connaître les limites de chaque technique microbiologique afin d'établir un diagnostic de certitude. La bonne prise en charge des patients atteints d'IOA repose sur une collaboration interdisciplinaire étroite entre chirurgiens, infectiologues et microbiologistes.

Pour en savoir plus

Ben Taarit C, Turki S, Ben Maiz H. Infectious spondylitis. Study of a series of 151 cases. Acta Orthop Belg 2002 ; 68(4) : 381–7.

Berbari EF, Marculescu C, Sia I, et al. Culture-negative prosthetic joint infection. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 2007 ; 45(9) : 1113–9.

Broy SB, Schmid FR. A comparison of medical drainage (needle aspiration) and surgical drainage (arthrotomy or arthroscopy) in the initial treatment of infected joints. Clin Rheum Dis 1986 ; 12(2) : 501–22.

Colmenero JD, Jiménez-Mejías ME, Sánchez-Lora FJ, et al. Pyogenic, tuberculous, and brucellar vertebral osteomyelitis : a descriptive and comparative study of 219 cases. Ann Rheum Dis 1997 ; 56(12) : 709–15.

Colmenero JD, Ruiz-Mesa JD, Sanjuan-Jimenez R, et al. Establishing the diagnosis of tuberculous vertebral osteomyelitis. Eur Spine J Off Publ Eur Spine Soc Eur Spinal Deform Soc Eur Sect Cerv Spine Res Soc 2013 ; 22(Suppl 4) : 579–86.

Cucurull E, Espinoza LR. Gonococcal arthritis. Rheum Dis Clin North Am 1998 ; 24(2) : 305–22.

Della Valle CJ, Sporer SM, Jacobs JJ, et al. Preoperative testing for sepsis before revision total knee arthroplasty. J Arthroplasty 2007 Sep 1 ; 22(6) : 90–3.

Desplaces N, Carsenti-Dellamonica H. Diagnostic de l'infection sur prothèse articulaire. In : Tirésias et SOFCOT. 2002. p. 39–46.

Ferroni A. Epidemiology and bacteriological diagnosis of paediatric acute osteoarticular infections. Arch Pédiatrie 2007 ; 14(Suppl 2) : S91–6.

Geipel U. Pathogenic organisms in hip joint infections. Int J Med Sci 2009 ; 6(5) : 234–40.

Goldenberg DL, Cohen AS. Acute infectious arthritis. A review of patients with nongonococcal joint infections (with emphasis on therapy and prognosis). Am J Med 1976 ; 60(3) : 369–77.

Gomez E, Cazanave C, Cunningham SA, et al. Prosthetic joint infection diagnosis using broad-range PCR of biofilms dislodged from knee and hip arthroplasty surfaces using sonication. J Clin Microbiol 2012 ; 50(11) : 3501–8.

Johnson AJ, Zywiel MG, Stroh DA, et al. Should Gram stains have a role in diagnosing hip arthroplasty infections ? Clin Orthop 2010 ; 468(9) : 2387–91.

Luqmani R, Joseph B, Robb J, et al. Textbook of orthopaedics, trauma and rheumatology. Elsevier Health Sciences ; 2012.

Margat E. Utilisation des tests moléculaires pour la détection rapide des bactériémies à Staphylococcus aureus résistants à la méticilline. J Anti-Infectieux 2012 ; 15(1) : 9–14.

Mathews CJ, Kingsley G, Field M, et al. Management of septic arthritis : a systematic review. Ann Rheum Dis 2007 ; 66(4) : 440–5.

McHenry MC, Easley KA, Locker GA. Vertebral osteomyelitis : long-term outcome for 253 patients from 7 Cleveland-area hospitals. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 2002 ; 34(10) : 1342–50.

Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, et al. Diagnosis and management of prosthetic joint infection : clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 2013 ; 56(1) : e1–e25.

Panousis K, Grigoris P, Butcher I, et al. Poor predictive value of broad-range PCR for the detection of arthroplasty infection in 92 cases. Acta Orthop 2005 ; 76(3) : 341–6.

Schäfer P, Fink B, Sandow D, et al. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection : a promising strategy. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 2008 ; 47(11) : 1403–9.

Sendi P, Rohrbach M, Graber P, et al. Staphylococcus aureus small colony variants in prosthetic joint infection. Clin Infect Dis 2006 ; 43(8) : 961–7.

Smith JW, Piercy EA. Infectious arthritis. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 1995 ; 20(2) : 225–30. quiz 231.

Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF), Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT), Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique (GPIP), et al. Clinical practice recommendations. Osteoarticular infections on materials (prosthesis, implant, osteosynthesis. Médecine Mal Infect 2009 ; 39(11) : 815–63.

Trampuz A, Hanssen AD, Osmon DR, et al. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. Am J Med 2004 ; 117(8) : 556–62.

Vandercam B, Jeumont S, Cornu O, et al. Amplification-Based DNA analysis in the diagnosis of prosthetic joint infection. J Mol Diagn JMD 2008 ; 10(6) : 537–43.

Widmer AF. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 2001 ; 33(Suppl 2) : S94–106.

Infections oculaires

F. Denis, V. Cattoir, M.-C. Ploy, M. Mounier

PLAN DU CHAPITRE

Introduction

La bactériologie des infections de l'œil a évolué durant ces dernières années grâce à l'amélioration des techniques d'isolement et d'identification des agents pathogènes potentiels par des méthodes traditionnelles, mais aussi grâce à de nouvelles techniques recherchant antigènes ou génome. Les techniques de biologie moléculaire, antérieurement utilisées sur d'autres prélèvements, sont également applicables aux prélèvements oculaires et sont susceptibles d'améliorer les performances du diagnostic.

Il est essentiel de connaître les bactéries impliquées dans les différentes infections oculaires afin d'adapter les méthodes de recherche en fonction de leurs particularités : fragilité, exigences de culture, caractéristiques antigéniques et génomiques, etc.

Les liquides endoculaires (humeur aqueuse et vitré, etc.) sont stériles, contrairement à la surface de l'œil qui possède une flore résidente commensale qu'il ne sera pas toujours facile de distinguer de la flore « pathogène ».

Rappel anatomoclinique

On oppose, en fonction de la localisation anatomique (Fig. 21.1), les infections superficielles dont les plus courantes sont représentées par les conjonctivites le plus souvent bénignes, et les infections intraoculaires, les endophtalmies et les infections orbitaires (cellulites) qui peuvent être gravissimes.

Mais, selon la localisation et l'aspect clinique, de nombreuses autres infections d'étiologie bactérienne peuvent être retrouvées au niveau de l'œil telles que les blépharites, les canaliculites, les cellulites, les dacryoadénites, les dacryocystites, les érysipèles, etc.

Les infections orbitaires correspondent à une invasion infectieuse de l'orbite soit hématogène, soit par contiguïté. L'origine sinusienne est impliquée dans les deux tiers des cas chez les adultes et dans 90 % des cas chez l'enfant. On distingue les cellulites préseptales et les cellulites rétroseptales ou vraies, respectivement en avant et en arrière du septum orbitaire. La forme rétroseptale représente une urgence thérapeutique.

Principales bactéries responsables d'infections oculaires superficielles

Certaines espèces bactériennes sont retrouvées plus fréquemment que d'autres, avec des variations, selon l'âge des patients.

En période néonatale, *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* occupent une place dominante. L'infection gonococcique est rare en France grâce aux instillations prophylactiques systématiques ; l'infection à *C. trachomatis* est non négligeable, variant de 1 à 12 % selon les centres.

Chez le nourrisson et l'enfant, *Haemophilus influenzae* occupe une place importante, surtout avant l'âge de 3 ans, mais *Streptococcus pyogenes* et *S. pneumoniae*, de même que *Branhamella catarrhalis* peuvent aussi être rencontrés.

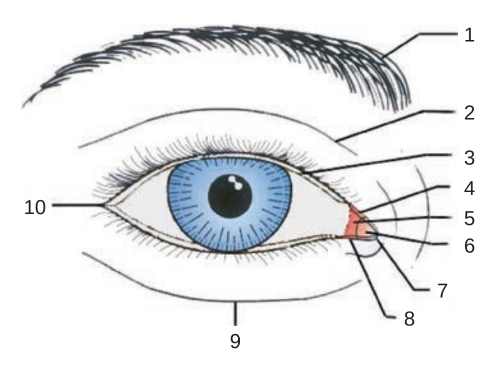
Chez l'adulte, *Staphylococcus aureus*, *Branhamella catarrhalis*, S. *pneumoniae* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées ; les autres streptocoques, les entérobactéries et les *Moraxella*, *Acinetobacter* et *Haemophilus* sont isolés plus rarement.

Dans les kératites, *S. aureus* et *S. epidermidis* sont les principaux agents (27 %) ; les autres bactéries à Gram positif – cocci : streptocoques (14,5 %) ou bacilles : corynébactéries ou autres (10 %) – occupent aussi une place importante. Parmi les bactéries à Gram négatif, *Neisseria* et *Branhamella* occupent une place restreinte (0,5 %), presque à égalité avec *Haemophilus*, la plus grande part revenant aux entérobactéries (12 %) et surtout aux *Pseudomonas* (29 %). La place de *C. trachomatis* est aussi sous-estimée dans les kératites ; cette espèce serait responsable d'au moins 4 % des kératites bactériennes.

Certaines étiologies ont été longtemps occultées ; ainsi, des tuberculoses oculaires (uvéites notamment) seraient retrouvées dans 0,6 à 10,5 % des tuberculoses.

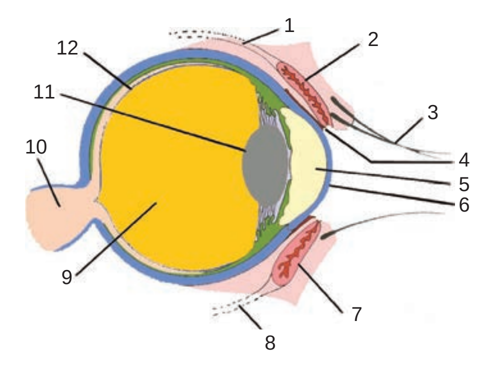
La nature des espèces bactériennes en cause varie selon que le patient est ou non porteur de lentilles, le port de lentilles favorisant l'infection par les bacilles à Gram négatif (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*).

Rappelons que le trachome dû à *C. trachomatis* (sérovars A, B, Ba et C) est responsable de conjonctivites trachomateuses qui évoluent en quatre stades, allant de la



1 : sourcil
2 : sillon palpébral supérieur
3 : bord libre de la paupière supérieure
4 : papille lacrymale supérieure
5 : pli semi-lunaire
6 : caroncule lacrymale
7 : angle interne
8 : papille lacrymale inférieure
9 : sillon palpébral inférieur
10 : angle latéral

Aspect externe des paupières



1 : septum orbital
2 : plateau tarsal supérieur contenant les glandes de Mebomius (infection de ces glandes = chalazion)
3 : cils (infection des glandes adjacentes = orgelet)
4 : conjonctive
5 : humeur aqueuse
6 : cornée
7 : plateau tarsal inférieur
8 : septum orbital
9 : humeur vitrée
10 : nerf optique
11 : cristallin
12 : rétine

Aspect anatomique de l'œil

Fig. 21.1 Rappel anatomique concernant l'œil.

conjonctivite folliculaire avec surinfection bactérienne fréquente à l'ulcère cornéen et l'uvéite. Cette maladie endémique sévit en zone intertropicale et est rarement évoquée sous nos latitudes. Les souches de *C. trachomatis* retrouvées en France dans les conjonctivites ou kératites appartiennent aux sérovars D, E, F, G, H, I, J et K.

Agents des endophtalmies bactériennes

On distingue les endophtalmies postopératoires, les endophtalmies exogènes opératoires et post-traumatiques avec ou sans corps étranger et les endophtalmies endogènes. Les infections postopératoires sont heureusement rares. Les publications récentes font état de taux d'infection allant de 0,28 à 0,5 %. L'incidence de l'infection oculaire est de l'ordre de 0,32 % après chirurgie réglée et de 2,8 % après plaie du globe oculaire. La répartition des germes révèle la place importante des bactéries à Gram positif et de *S. epidermidis* tout particulièrement ; de même, une progression de la fréquence des infections à streptocoques-entérocoques est signalée. Dans les endophtalmies postchirurgicales, *Pseudomonas aeruginosa* occupe une place importante.

Agents des infections orbitaires

Les germes les plus fréquents observés chez l'adulte sont *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*. Chez l'enfant, on retrouve plutôt *Haemophilus influenzae*, mais la vaccination a permis de réduire considérablement cette fréquence.

Dans les cellulites préseptales, *Haemophilus influenzae* b était responsable avant vaccination de près de 80 % des cellulites d'origine hématogène.

Dans les cellulites orbitaires vraies, les bactéries impliquées sont généralement celles responsables de sinusites aiguës et d'infections cutanées.

Chez l'enfant de moins de 9 ans, plus de 80 % des infections sont monomicrobiennes (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, etc.) ; plus tard, il n'est pas rare que l'infection soit polymicrobienne avec implication de deux à cinq germes aérobies et/ou anaérobies.

On retrouve les trois espèces citées précédemment, mais aussi *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* ou à coagulase négative, *Streptococcus pyogenes*, *agalactiae* ou du groupe *milleri*.

On peut aussi retrouver des anaérobies, des entérobactéries, etc.

Mais on doit rechercher en parallèle les agents de mucormycoses, d'aspergillose, voire des helminthes.

Diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique est essentiellement un diagnostic direct, reposant classiquement sur la mise en évidence des bactéries par examen direct et culture, mais aussi par mise en évidence de constituants bactériens spécifiques (génomes, antigènes).

Le diagnostic indirect sérologique a beaucoup moins d'intérêt, les infections bactériennes induisant rarement une réponse immune importante et les sérologies étant assez peu spécifiques.

Infections superficielles

Prélèvements

Les prélèvements doivent être effectués avant tout traitement local ou général (antiseptique ou antibiotique) et avant toute toilette oculaire depuis plusieurs heures. Dans le cas de patient recevant un tel traitement, celui-ci doit être suspendu depuis au moins 24 heures. Les prélèvements de conjonctive ou de cornée peuvent être effectués :

- soit avec un coton monté très serré, stérile, en présentation unitaire ;
- soit avec une spatule en platine de Kimura préalablement stérilisée, puis refroidie avant l'usage.

Dans le cas de prélèvements pour conjonctivite, un frottement doux de la conjonctive inférieure est effectué en partant de l'angle externe pour aboutir à l'angle interne de l'œil où l'on récupère la sécrétion.

Dans le but de diagnostiquer une infection à *Chlamydia*, il est indispensable de recueillir de nombreuses cellules, car il s'agit d'une bactérie à développement intracellulaire. Les conjonctives sont raclées prudemment soit avec des écouvillons en plastique imprégnés d'alginate, soit avec du matériel ophtalmologique. La qualité du prélèvement conditionne celle des résultats.

Les prélèvements doivent être acheminés rapidement au laboratoire (moins de 2 heures) pour mise en culture, même si des frottis ont été réalisés sur place au lit du malade ; ils ne doivent pas arriver desséchés au laboratoire ; il ne faut pas non plus les noyer en plaçant l'écouvillon dans un volume important de sérum physiologique. Le recours à des milieux de transport généraux (Portagerm®, eSwab®, etc.) ou spécifiques pour *C. trachomatis* est nécessaire si le prélèvement n'est pas réalisé au laboratoire. De même, il faut recourir à des milieux de transports spécifiques si on veut réaliser différents tests immuno-enzymatiques à la recherche d'antigènes bactériens et pour certaines techniques de biologie moléculaire.

Diagnostic direct

L'examen cytobactériologique du frottis avec coloration au May-Grünwald-Giemsa permet de caractériser les éléments cellulaires présents : polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles, lymphocytes, monocytes, cellules épithéliales. Il constitue un élément d'orientation étiologique non négligeable. La coloration de Gram permet de préciser l'absence ou la présence de bactéries et d'évoquer tel ou tel genre bactérien, *Staphylococcus, Streptococcus, Neisseria, Corynebacterium*, etc.

La mise en culture nécessite l'emploi en routine de milieux riches (trypticase-soja, Mueller-Hinton, gélose au sang, etc.) et de milieux pour bactéries exigeantes (gélose « chocolat » additionnée de facteurs de croissance) qui seront incubés à 37 °C en atmosphère enrichie en CO_2. Des milieux solides et liquides pour la recherche de bactéries anaérobies seront aussi utilisés. Les milieux seront observés pendant 3 à 5 jours. Une quantification des germes présents au niveau conjonctival permet, selon Cagle, d'évaluer l'imputabilité des différentes espèces (Tableau 21.1).

Même si ces critères sont critiquables, ils sont souvent utilisés.

Tableau 21.1 **Critères quantitatifs permettant de retenir l'implication d'espèces bactériennes dans l'étiologie de conjonctivites (d'après Cagle).**

Groupe I : seuil = 1 UFC*/ml (nombre de colonies > 0)
Streptococcus pyogenes *Streptococcus pneumoniae* *Neisseria* spp. *Moraxella* spp. *Haemophilus* spp. *Acinetobacter* spp. *Pseudomonas* spp. *Achromobacter* spp. *Enterobacteriaceae* *Proteus/Morganella* *Citrobacter* spp. *Escherichia* *Klebsiella* *Serratia*
Groupe II : seuil = 10 UFC/ml (nombre de colonies ≥ 10)
Staphylococcus aureus Autres *Streptococcus* spp. *Enterococcus* spp. *Moraxella catarrhalis*
Groupe III : seuil = 100 UFC/ml (nombre de colonies ≥ 10^2)
Staphylococcus epidermidis ou autres *Staphylococcus* à coagulase négative *Micrococcus* spp. *Bacillus* spp.
Groupe IV : seuil = 1000 UFC/ml (nombre de colonies ≥ 10^3)
Corynebacterium spp. (diphtéroïdes)

* UFC : unité formant colonie.

L'identification repose sur la morphologie des germes et sur leur galerie d'identification (caractères respiratoires, exigences nutritionnelles, métaboliques glucidiques, protéiques, etc.) sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF, l'antibiogramme complétant l'identification.

Dans le cas particulier de *C. trachomatis*, on ne peut pas utiliser, comme pour les autres bactéries, des milieux synthétiques ; leur culture nécessite l'inoculation de cultures cellulaires MacCoy, HeLa 229, etc. La sensibilité de la culture cellulaire a été améliorée en bloquant la prolifération cellulaire par un traitement à la cycloheximide, par une étape de centrifugation du prélèvement favorisant l'entrée des bactéries dans les cellules et par l'utilisation d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux fluorescents ou marqués à la peroxydase révélant des inclusions caractéristiques après 2 à 3 jours de cultures. Cependant, ces techniques ont été délaissées au profit de la PCR, plus sensible.

On peut tenter d'identifier les bactéries directement à partir du produit pathologique par des méthodes immunologiques :

- soit en visualisant de manière spécifique les corps bactériens ou leurs inclusions révélés par des anticorps en immunofluorescence ou par immunoperoxydase ; cela peut s'appliquer à *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae* capsulés, *S. pneumoniae* et certains streptocoques (groupes A, B, C, etc.) en visualisant les corps bactériens, et à *C. trachomatis* (visualisation des corps réticulés, corps élémentaires, en utilisant des anticorps soit polyclonaux, soit monoclonaux, détectant tous les sérotypes de *C. trachomatis*) ;

- soit en utilisant d'autres techniques permettant de révéler la présence d'antigènes solubles (ou extractibles) à l'aide de techniques immuno-enzymatiques (ELISA).

Les recherches de génome par hybridation (sondes chaudes ou froides) manquent de sensibilité. En revanche, les techniques d'amplification génique se sont beaucoup développées et sont très sensibles. Actuellement, il existe des trousses permettant la recherche de *C. trachomatis* et de *N. gonorrhoeae* sur produits génitaux; pour cette recherche génomique, il faut respecter les recommandations (matériel de prélèvement, etc.) du fabricant. Les premiers résultats obtenus avec ces trousses utilisées pour rechercher ces germes sur des prélèvements oculaires révèlent une supériorité des techniques de PCR, sur les recherches d'antigènes ou sur les cultures.

Cela a été vérifié pour *C. trachomatis* dans un contexte de trachome, mais aussi dans des contextes de conjonctivites non trachomateuses. Des tests de PCR quantitative ont également été développés avec succès pour *C. trachomatis*. Des PCR utilisant des amorces spécifiques d'autres germes peuvent aussi être utilisées. Ainsi, les PCR spécifiques utilisées fréquemment sur les LCR, dans le cas de méningites, peuvent être appliquées aux prélèvements oculaires. Peuvent être recherchés les génomes de *S. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*. On a utilisé des PCR « nichées » pour rechercher des bactéries à Gram positif et à Gram négatif et également *Mycobacterium tuberculosis*. Enfin, l'utilisation d'une PCR « universelle » détectant l'ADN codant l'ARN ribosomique 16S a aussi été appliquée dans le cas d'infections oculaires. Ainsi, tout génome bactérien est potentiellement amplifiable, mais les prélèvements ne doivent pas être contaminés par des bactéries de la flore commensale.

Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect a peu d'intérêt. Il peut essentiellement être utilisé pour compléter, chez les enfants et les adultes, le diagnostic des infections à *Chlamydia*. Les nouveau-nés reçoivent les anticorps passifs d'origine maternelle (IgG), ce qui complique le diagnostic, sauf s'ils possèdent des anticorps anti-*Chlamydia* dans la fraction IgM, ce qui signe une synthèse d'anticorps propre à l'enfant.

En cas d'uvéite, la sérologie peut trouver sa place à la recherche d'une maladie de Lyme, d'une rickettsiose ou d'une bartonellose.

En conclusion, le diagnostic bactériologique d'infection oculaire superficielle repose sur le recours à la bactériologie traditionnelle, mais également de plus en plus, tant dans les infections superficielles que dans les endophtalmies, à la recherche de génomes bactériens. Ces dernières approches rendent accessible le diagnostic d'infection à *Chlamydia*, même pour un laboratoire non spécialisé.

Enfin, dans un contexte d'infection oculaire superficielle, une recherche de virus, de parasites (amibes) et de champignons doit être systématiquement associée au diagnostic bactériologique.

Endophtalmies/infections orbitaires

La confirmation du diagnostic d'endophtalmie ne peut être obtenue que par la mise en culture de prélèvements d'humeur aqueuse et/ou de vitré. En revanche, le diagnostic d'infection orbitaire repose essentiellement sur l'examen clinique et l'imagerie.

Prélèvements

Pour les endophtalmies

La technique de prélèvement de l'humeur aqueuse a été décrite par Forster en 1974 : incision cornéenne périphérique non perforante, puis introduction d'une aiguille fine en prenant bien soin de ne pas léser l'endothélium et le cristallin, recueil de 0,1 à 0,2 ml d'humeur aqueuse qui est immédiatement ensemencé sur différents milieux de culture (Fig. 21.2).

Chez l'aphake (sujet n'ayant plus de cristallin), l'incision cornéenne est élargie et une deuxième aiguille est poussée dans le vitré qui est alors aspiré (0,2 à 0,3 ml peut ainsi être récupéré). Chez les patients phakes (sujets ayant gardé leur cristallin), le vitré est aspiré (Fig. 21.3) après réalisation d'une perforation sclérale à 3,5 mm du limbe (selon certains auteurs, cette technique devrait aussi s'appliquer à l'aphake car la voie d'abord antérieure favoriserait la contamination du vitré). Si le prélèvement est insuffisant ou si une vitrectomie thérapeutique est prévue, l'orifice scléral est agrandi pour permettre l'introduction d'un vitréotome. Il est évident qu'il s'agit de prélèvements précieux qui doivent être acheminés rapidement au laboratoire (moins de 15 minutes).

Les prélèvements vitréens (Fig. 21.3), dilués par la solution d'irrigation, doivent être filtrés avant d'ensemencer les différents milieux de culture.

À noter que lorsqu'une infection fongique est suspectée, les prélèvements doivent être réalisés au niveau des exsudats

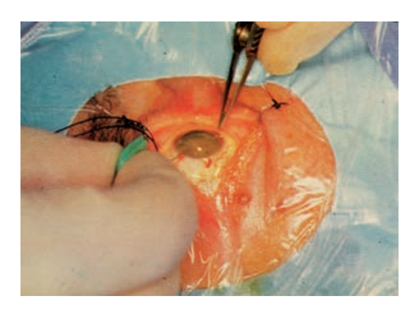


Fig. 21.2 Prélèvement de l'humeur aqueuse au début d'une intervention de la cataracte à l'aide d'une épicrânienne.



Fig. 21.3 Prélèvement du vitré lors d'une vitrectomie pour cataracte traumatique et endophtalmie.

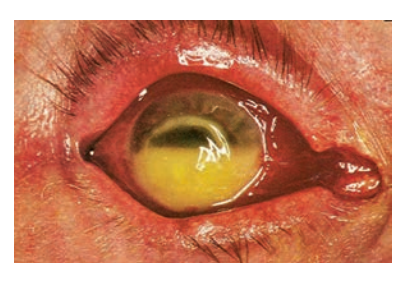


Fig. 21.4 **Endophtalmie à *Staphylococcus aureus* suite à un corps étranger intraoculaire.**

et des foyers inflammatoires car des études histologiques ont démontré qu'ils contenaient des champignons.

Lorsqu'une vitrectomie est pratiquée, il est nécessaire de filtrer la totalité du liquide vitréen sur membrane Millipore®.

L'examen de l'œil est parfois très évocateur d'une endophtalmie (Fig. 21.4) avec pus et examen direct positif.

L'étude microbiologique des prélèvements comporte en fait deux étapes : l'examen direct sur lame et la réalisation de cultures.

Pour les infections orbitaires

Dans les infections orbitaires, la recherche de l'agent pathogène reste fondamentale pour l'administration d'un traitement anti-infectieux adapté. Les cultures peuvent être effectuées à partir des prélèvements sinusiens, conjonctivaux, cutanés ou sanguins. Il est donc recommandé de prélever tout pus externe et/ou de ponctionner à l'aiguille fine sous anesthésie locale le sinus incriminé (par voie endonasale) ou l'orbite (par voie antérieure). En cas de recours à la chirurgie, le prélèvement de pus orbitaire ou sinusien lors du drainage chirurgical est l'idéal, et assure un diagnostic microbiologique dans environ 90 % des cas. Les tissus nécrotiques peuvent aussi être biopsiés. Enfin, une ponction lombaire peut être réalisée en cas de signes de méningite associés.

Alors que les hémocultures sont généralement négatives chez le grand enfant et l'adulte, elles sont positives dans 4 à 8 % des cas chez le jeune enfant. Ainsi, le prélèvement d'hémocultures est fortement recommandé, notamment si le tableau clinique est compatible avec celui d'une cellulite orbitaire vraie. Au niveau biologique, il existe un syndrome inflammatoire avec hyperleucocytose dans 64 à 85 % des cas, souvent plus prononcé dans les cellulites orbitales vraies.

Diagnostic direct

L'examen direct après coloration de Gram, de Giemsa ou de Grocott permet d'affirmer la présence de germes et, s'ils sont présents (en petit nombre), cet examen peut permettre une orientation diagnostique. Il a comme avantage d'être rapide mais présente deux inconvénients : s'il montre des germes, il ne précise pas toujours l'espèce en cause et, s'il n'en montre pas, il ne permet pas d'éliminer une infection endoculaire (faux négatif).

Les cultures sont pratiquées sur milieux solides riches (gélose au sang, gélose « chocolat » enrichie en facteurs de croissance, etc.), ensemencées à 37 °C en atmosphère enrichie en CO_2 et sur milieux liquides (thioglycolate, bouillon cœur-cervelle, etc.). L'incubation de 5 à 8 jours peut être prolongée en cas de suspicion d'anaérobies ou de certains germes. Certains auteurs préconisent de garder les bouillons de Schaedler incubés à 37 °C et de Sabouraud à 30 °C jusqu'à 21 jours. La recherche de bactéries anaérobies doit être effectuée systématiquement sur milieux solides et de préférence aussi sur milieux liquides (Schaedler, etc.). De plus, une culture à température ambiante sur milieu spécifique (Sabouraud) est recommandée, notamment pour la recherche des champignons. Pour qu'une culture soit considérée comme positive, il faut qu'un micro-organisme se développe sur deux ou plusieurs milieux, ou de manière semi-confluente sur un ou plusieurs milieux solides au niveau du point d'inoculation. Une culture équivoque se définit par la croissance d'un micro-organisme sur un milieu liquide ou une faible croissance sur un milieu solide uniquement. Il faut savoir que la réalisation de prélèvements ne permet de mettre en évidence un agent infectieux que dans un cas sur deux.

Pour Forster, l'aspiration du vitré donne de meilleurs résultats que la ponction de la chambre antérieure. Mais un prélèvement négatif au niveau de la chambre antérieure ne permet pas d'éliminer une infection endoculaire et il faut pratiquer systématiquement un prélèvement vitréen devant une suspicion d'endophtalmie.

Malgré tout, un grand nombre de prélèvements donnent lieu à une culture négative ; il faut alors discuter la réalité de l'infection oculaire et éliminer une inflammation oculaire ; celle-ci étant écartée, la possibilité d'une endophtalmie bactérienne, voire fongique, ne peut être exclue.

Compte tenu de la fréquence des endophtalmies aiguës ou chroniques et des infections orbitaires dont les prélèvements restent stériles, et vu la gravité de ces infections, il est nécessaire d'envisager la recherche de tout génome bactérien par amplification génique d'ADN codant l'ARN 16S et de pratiquer des PCR spécifiques à la recherche des espèces les plus fréquentes dans les infections intraoculaires.

Même si la méthode de PCR universelle (amplification d'ADN de toute bactérie et/ou champignon) n'a pas encore été appliquée au diagnostic d'infections orbitaires, cette technique constituerait une alternative très intéressante, à l'instar du diagnostic étiologique moléculaire des uvéites infectieuses ou des endophtalmies.

Enfin, en cas de suspicion d'infection orbitaire tuberculeuse, outre la mise en culture sur milieux et conditions spécifiques, le dosage de l'interféron γ peut être utile.

Conclusion

Les techniques de diagnostic bactériologique des infections oculaires se situent à un virage ; nous sommes à la veille du saut de la bactériologie pasteurienne au diagnostic tout moléculaire, et la bactériologie des infections oculaires devrait bénéficier de ces progrès mais, pendant encore quelques années, il y aura cohabitation des cultures traditionnelles et des outils de biologie moléculaire. Mais à ce jour, seule la culture permet de disposer d'un antibiogramme. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que, quelle que soit l'approche diagnostique, la qualité des résultats dépend de la qualité du prélèvement et que, pour obtenir de meilleurs résultats, la collaboration clinicien–biologiste est indispensable.

Pour en savoir plus

Adenis JP, Denis F, Colin J, et al. L'endophtalmie. Pénétration intra-oculaire des agents antimicrobiens. Paris : Ellipses ; 1988.

Adenis JP, Denis F, Bron A, et al. Infections et inflammations du segment antérieur de l'œil. Éditions médicales MSD ; 1989.

Biswas J, Roy Chowdhury B, Krishna Kumar S, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction in a case of orbital tuberculosis. Orbit 2001 ; 20 : 69–74.

Cagle GD, Abshire RL. Quantitative ocular bacteriology : a method for the numeration and identification of bacteria from the skin-lash margin and conjonctiva. Invest Ophthalmol Vis Sci 1981 ; 20 : 751–7.

Carrol NM, Jaeger EEM, Choudhury S, et al. Detection and discrimination between Gram-positive and Gram-negative bacteria in intraocular samples by using nested PCR. J Clin Microbiol 2000 ; 36 : 1753–7.

Chaumeil C, Maubon D, Paugam A, et al. Infections oculaires. In : RÉMIC. Société française de microbiologie ; 2015. p. 247–62.

Denis F, Ploy MC, Rogez S, et al. Infections oculaires bactériennes : méthodes de diagnostic actuelles et prospectives. Ann Biol Clin 1999 ; 57 : 401–8.

Forster RK. Etiology and diagnosis of bacterial post-operative endophtalmitis. Ophtalmology 1978 ; 85 : 320–6.

Leibowitz HM. The red eye. New Engl J Med 2000 ; 343 : 345–51.

Liotet S, Morin Y. Guide pratique des examens de laboratoire en ophtalmologie. Paris : Masson ; 1988.

Mabey D, Solomon Anthony W. Application of molecular tools in the control of blinding trachoma. Am J Trop Med Hyg 2003 ; 69 : 11–7.

Mouriaux F, Rysanek B, Cattoir V, et al. Infections orbitaires. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Ophtalmologie ; 2011. 21-650-A-15.

Ortega-Larrocea G, Bobadilla-Del-Valle M, Ponce-de-Leon A, et al. Nested polymerase chain reaction for Mycobacterium tuberculosis DNA detection in aqueous and vitreous patients with uveitis. Arch Med Res 2003 ; 34 : 116–9.

Schabereiter-Gurtner C, Maca S, Rolleke S, et al. 16S rDNA-based identification of bacteria from conjunctival swabs by PCR and DGGE fingerprinting. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001 ; 42 : 1164–71.

Solomon AW, Holland MJ, Burton MJ, et al. Strategies for control of trachoma : observational study with quantitative PCR. Lancet 2003 ; 362 : 198–204.

Sowmya P, Madhavan HN. Diagnostic utility of polymerase chain reaction on intraocular specimens to establish the etiology of infectious endophthamitis. Eur J Ophthalmol 2009 ; 19 : 812–7.

Thompson MJ, Albert DM. Ocular tuberculosis. Arch Ophtalmol 2005 ; 123 : 844–9.

Wilhemus KR, Liesegang TJ, Osato MS, et al. Laboratory diagnosis of ocular infections. Cumitech 13 A. Washington : ASM Press ; 2005.

Infections génitales chez l'homme

L. Mereghetti, P. Lanotte, R. Quentin

PLAN DU CHAPITRE

Introduction

Les pathologies génitales infectieuses sont relativement courantes chez l'homme. Cependant, la distinction entre les infections urogénitales et les infections sexuellement transmissibles est parfois complexe. En effet, les infections urogénitales peuvent être sexuellement transmissibles (urétrites à gonocoque ou à *Chlamydia trachomatis*) ou non sexuellement transmissibles (prostatites à *Escherichia coli*). À l'inverse, certaines infections sexuellement transmissibles ne conduisent pas à une infection urogénitale mais entraînent une symptomatologie « générale » (infections à VIH ou hépatite B). Nous limiterons ce chapitre à la description des prélèvements génitaux utiles pour établir le diagnostic étiologique des infections génitales.

Trois entités nosologiques doivent être distinguées : les ulcérations génitales, les urétrites, et les infections plus profondes (prostatites, épididymites, etc.) (Fig. 22.1). Les ulcérations génitales et les urétrites sont le plus souvent liées à une contamination vénérienne.

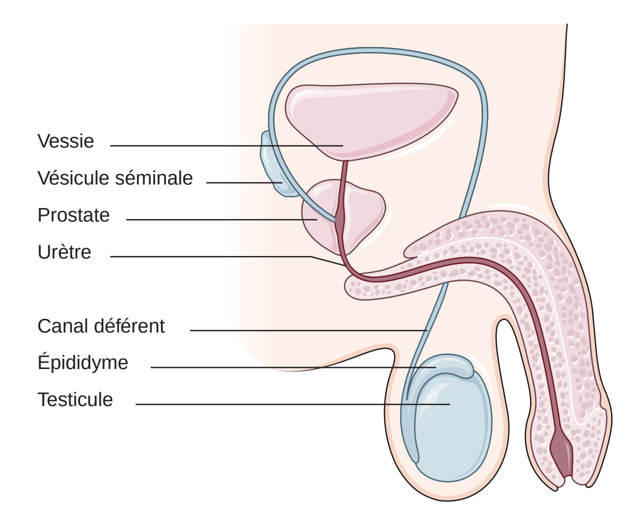


Fig. 22.1 Représentation schématique de l'appareil génital masculin.

Ulcérations génitales

Rappel anatomoclinique et pathogenèse

Chez l'homme, les ulcérations génitales sont situées sur le gland, le sillon balanopréputial ou plus rarement sur la verge. Elles peuvent avoir une étiologie bactérienne ou virale (les herpès sont une cause fréquente d'ulcérations, beaucoup plus rarement la varicelle, la mononucléose infectieuse ou les infections à cytomégalovirus [CMV] chez l'immunodéprimé). La présence d'une ulcération génitale doit faire rechercher de principe des ulcérations sur une autre localisation anatomique (bouche, anus). Il faut également rechercher les agents infectieux transmissibles par voie vénérienne et inclure dans le bilan les sérologies virales (VIH, VHB, VHC). Enfin, il est impératif de faire consulter la (ou les) partenaire(s).

Quatre bactéries, transmises par voie sexuelle, peuvent être à l'origine d'ulcérations génitales.

- Le chancre syphilitique (dû à *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*) correspond à la phase de syphilis primaire. Il apparaît environ 3 semaines après le contact sexuel contaminant. Classiquement, il s'agit d'une lésion érosive, le plus souvent unique, circulaire, de 5 à 10 mm de diamètre, non douloureuse, dure, à fond propre et à bords réguliers. Elle est spontanément résolutive en 4 à 6 semaines. Le chancre peut s'accompagner d'une ou de plusieurs adénopathie(s) satellite(s) en région inguinale, également indolore(s). Plus rarement, le chancre a un aspect atypique (chancres géants, chancres multiples, chancres douloureux, etc.). La culture de *T. pallidum* étant impossible, le diagnostic biologique de syphilis primaire repose sur la mise en évidence du tréponème en microscopie optique à fond noir, sur la PCR et sur la sérologie.

- La lymphogranulomatose vénérienne ou maladie de Nicolas-Favre est une maladie rare en Europe, alors qu'elle est répandue dans les régions tropicales et subtropicales. Elle est cependant en augmentation constante dans la population des homosexuels masculins (forme anorectale), mais pas dans la population masculine hétérosexuelle ni dans la population féminine. Elle est due aux sérovars L1, L2, L2a et L3 de *Chlamydia trachomatis*. La symptomatologie apparaît entre 1 et 3 semaines après le contact sexuel contaminant. Elle débute par l'apparition de petites ulcérations non douloureuses, qui correspondent aux lésions primaires, rapidement et spontanément résolutives. Ultérieurement apparaît une lymphadénite inguinale douloureuse, pouvant fistuliser à la peau en «pomme d'arrosoir», qui correspond à la phase secondaire de la maladie. Le diagnostic biologique de lymphogranulomatose vénérienne repose sur la mise en évidence de *Chlamydia trachomatis* par PCR, qui a désormais supplanté les autres techniques.
- Le chancre mou est une maladie rare en Europe, alors qu'elle sévit dans les régions tropicales. Il est dû à *Haemophilus ducreyi*. La symptomatologie apparaît environ 1 semaine après le contact sexuel contaminant. Classiquement, il s'agit d'une lésion érosive multiple, inflammatoire, douloureuse, non indurée, avec des bords présentant un aspect mucopurulent. L'ulcération s'accompagne d'une adénopathie, inconstante, tendue et douloureuse, contenant du pus franc. Le diagnostic biologique de chancre mou repose sur la mise en évidence d'*H. ducreyi* sur les prélèvements par examen direct et par culture.
- La donovanose est une maladie très rare en Europe, alors qu'elle est endémique dans certaines régions du globe (Nouvelle-Guinée, Australie, Afrique du Sud, Inde, Brésil, etc.). Elle est due à *Klebsiella granulomatis* (anciennement *Calymmatobacterium granulomatis*). La symptomatologie apparaît entre 1 et 2 mois après le contact sexuel contaminant. Classiquement, il s'agit d'une lésion papulaire ou nodulaire indolore, évoluant rapidement en donnant une ulcération bourgeonnante et saignotante, également indolore, à bords surélevés. On n'observe pas d'adénopathie à proprement parler, mais une diffusion sous-cutanée de l'infection. Le diagnostic biologique de donovanose repose sur la mise en évidence de *K. granulomatis* par microscopie et par PCR.

Diagnostic bactériologique direct (Fig. 22.2)

Prélèvements

Le prélèvement du chancre ou de l'ulcération doit être impérativement réalisé au laboratoire, afin d'observer rapidement le frottis au microscope, avec ou sans coloration. La ponction ganglionnaire devrait également être réalisée au laboratoire.

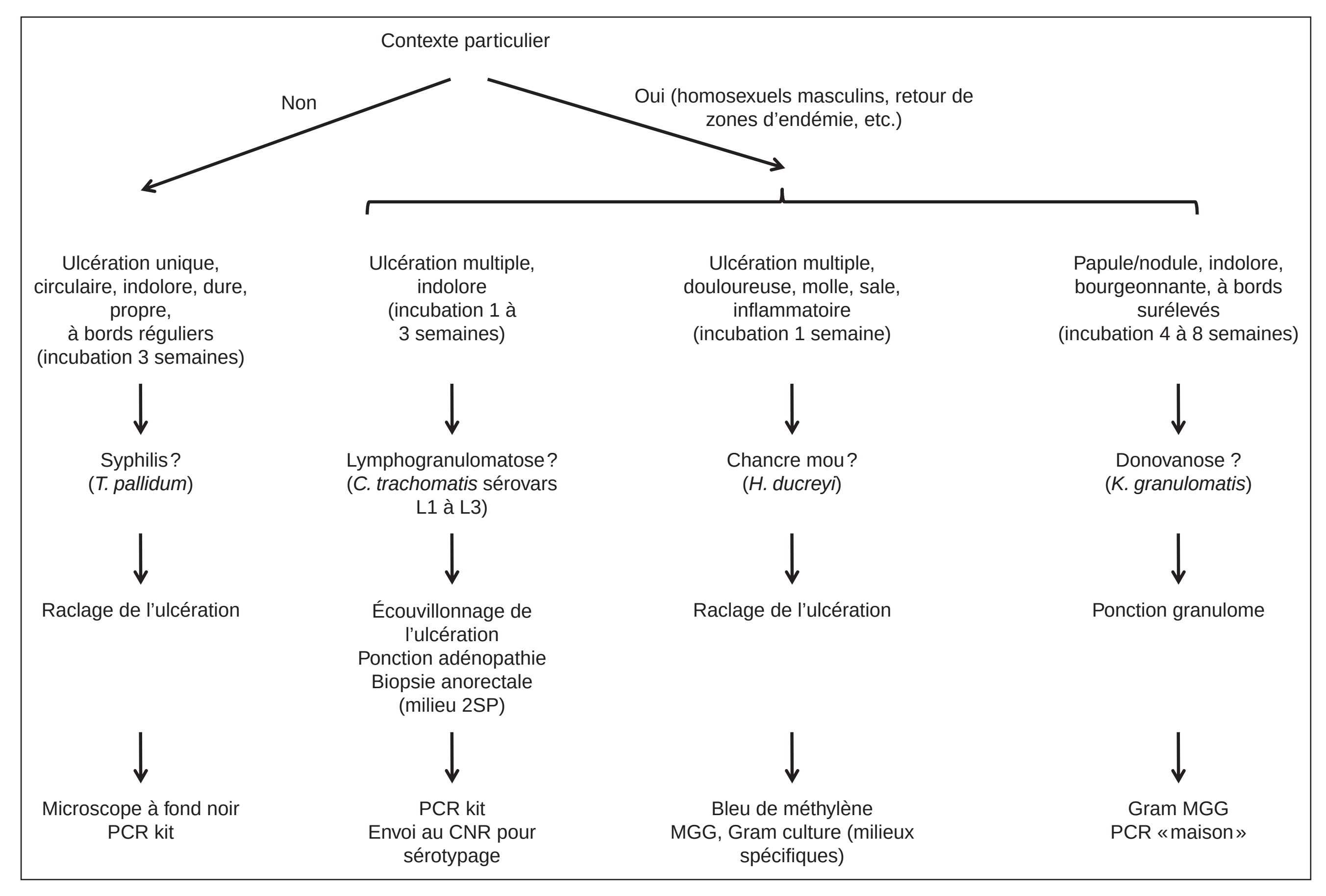


Fig. 22.2 **Conduite à tenir en cas d'ulcération génitale chez l'homme.**

Après nettoyage de la lésion à l'eau stérile, le prélèvement à la recherche des tréponèmes est pratiqué avec une curette, un vaccinostyle ou tout instrument non traumatisant permettant le raclage du centre de la lésion et le recueil de la sérosité. On peut aussi simplement apposer la lamelle sur la lésion. Il est important de ne pas faire saigner la lésion et de ne pas utiliser d'écouvillon. Il peut être intéressant de refaire un frottis à partir d'un nouveau prélèvement réalisé quelques minutes après le premier prélèvement, car le second prélèvement est plus riche en tréponèmes. Il est également possible de réaliser une ponction ganglionnaire : le liquide de ponction sera examiné selon les mêmes modalités que la sérosité du chancre.

Le prélèvement à la recherche de *Chlamydia trachomatis* dans le cadre d'une lymphogranulomatose vénérienne permet le recueil de la sérosité de l'ulcération génitale après grattage de l'ulcération. La ponction du ganglion peut également être contributive, de même que la biopsie de l'ulcération anorectale.

Le prélèvement du chancre mou se fait après grattage de la lésion à la curette. La ponction du bubon est également contributive.

Compte tenu de l'évolution rapide des ulcérations génitales, la mise en évidence de *Klebsiella granulomatis* se fait essentiellement par ponction du granulome inguinal.

Démarche du diagnostic direct sur le produit pathologique

Examen direct

La recherche de tréponème se fait à partir de la sérosité, qui est immédiatement placée entre lame et lamelle (éventuellement avec quelques gouttes de sérum physiologique), et observée au microscope à fond noir, à un grossissement ×400. Le tréponème possède une morphologie hélicoïdale, et présente trois types de mouvements : mouvements de rotation autour de son axe, mouvements flexueux reptiliens et progression en vrille. Cet examen manque de sensibilité et de spécificité.

Haemophilus ducreyi est un bacille à Gram négatif, court voire coccobacillaire, de coloration bipolaire, mais prenant mal la coloration de Gram. En revanche, il présente un aspect caractéristique en courtes ou longues chaînettes de petits bacilles typiquement en « chaîne de vélo » par coloration au bleu de méthylène ou au May-Grünwald-Giemsa.

Au cours de la donovanose, les corps de Donovan intracellulaires peuvent être visualisés par coloration de May-Grünwald-Giemsa.

Cultures

Milieux de culture

L'isolement d'*Haemophilus ducreyi* est difficile. La culture se fait sur milieux gélosés riches, type chocolat Polyvitex® additionné de 5 à 10 % de sérum de veau fœtal ou milieu Columbia enrichi de sang de lapin, à partir des prélèvements obtenus par grattage de l'ulcération ou par ponction du bubon. L'incubation des milieux est réalisée en atmosphère enrichie en 5 à 10 % de CO_2, au moins 48 heures et jusqu'à 10 jours (dans ce cas, il est utile d'utiliser un milieu rendu sélectif par addition de 5 µg/ml de vancomycine). La température idéale d'incubation est de 33 à 35 °C.

Identification

L'identification d'*H. ducreyi* est difficile en raison de la pauvreté des caractères biochimiques positifs et aucune galerie ne permet le diagnostic d'espèce. Le diagnostic est donc présomptif sur la base de l'aspect morphologique du chancre, sur l'aspect typique des bacilles par la coloration au bleu de méthylène, et sur la morphologie de colonies (petites, brillantes, grisâtres, avec une collerette transparente à bords rugueux, se prenant mal avec l'öse). Les colonies sont colorées au bleu de méthylène, permettant d'observer l'aspect typique en « chaîne de vélo ».

Biologie moléculaire

- *Chlamydia trachomatis* : différentes techniques d'amplification génique sont actuellement commercialisées. Elles sont souvent couplées à la recherche de *Neisseria gonorrhoeae*, plus rarement à celle de *Mycoplasma genitalium*. Elles sont très sensibles et très spécifiques, mais relativement onéreuses. Le contrôle après traitement ne doit pas être réalisé avant 6 semaines après l'arrêt de l'antibiotique. En cas de lymphogranulomatose vénérienne, il faut réaliser un génotypage de la bactérie (effectué par le Centre national de référence [CNR] des Chlamydia).
- *Treponema pallidum* : plusieurs cibles peuvent être utilisées pour l'amplification génique. Les différentes techniques ont une bonne sensibilité et une très bonne spécificité.
- *Klebsiella granulomatis* : la mise en évidence de *K. granulomatis* par PCR relève plutôt de techniques « maison ».
- *Haemophilus ducreyi* : le recours des PCR « maison » a donné en zone d'endémie des résultats encourageants.

Diagnostic bactériologique indirect

La sérologie est la méthode la plus courante pour le diagnostic de syphilis. Il existe deux types de réactions : les réactions à antigènes non tréponémiques utilisant des antigènes cardiolipidiques et des réactions à antigènes tréponémiques.

Selon la nomenclature des actes de biologie médicale actuellement en vigueur, le sérum doit être testé à la fois par une technique utilisant une réaction non tréponémique (type RPR [*rapid plasma reagin*] ou VDRL [*veneral disease research laboratory*]) et par une technique utilisant une réaction tréponémique (type TPHA [*Treponema pallidum hemagglutination assay*], ELISA [*enzyme linked immunosorbent assay*], FTA-abs [*fluorescent treponemal antibody absorbed*] ou un immunotransfert [*Western-blot, Immuno blot*]). Le FTA-abs se positive concomitamment au chancre ou peu après; le TPHA se positive environ 1 semaine après l'apparition du chancre; et le VDRL entre 2 et 3 semaines après l'apparition du chancre (voir chapitre 33.4).

Cependant, l'Union nationale des caisses d'assurance maladie (UNCAM) et le CNR de la syphilis ont proposé en mai 2015 une modification de la nomenclature des actes de biologie médicale, à laquelle la Haute autorité de santé (HAS) a donné un avis favorable. La proposition est de remplacer l'association systématique d'emblée d'un test tréponémique et d'un test non tréponémique par un seul test tréponémique sur Ig totales, avec une méthode reproductible et automatisable de type immuno-enzymatique (technique d'ELISA ou apparentée), qui sera confirmé par un test non tréponémique quantitatif en cas de positivité du test tréponémique initial.

Urétrites

Rappel anatomoclinique et pathogenèse

L'urétrite est une inflammation de l'urètre, le plus souvent d'origine infectieuse, et transmise lors de contact sexuel. Dans plus de la moitié des cas, elle se manifeste par un écoulement urétral clair ou purulent; dans les autres cas, on observe une dysurie, une pollakiurie ou des brûlures mictionnelles. Comme pour toute infection sexuellement transmise, il faut rechercher les autres pathogènes transmissibles par voie vénérienne et inclure dans le bilan les sérologies virales. Enfin, il est important de faire consulter la (ou les) partenaire(s).

Il est classique de distinguer les urétrites gonococciques, dues à *Neisseria gonorrhoeae*, et les urétrites non gonococciques dues à *Chlamydia trachomatis*, à certains mycoplasmes génitaux (*Mycoplasma genitalium, Ureaplasma* spp.) et à *Trichomonas vaginalis* (Tableau 22.1).

- *Neisseria gonorrhoeae* est responsable d'urétrite aiguë symptomatique, survenant 2 à 5 jours après le contact contaminant. L'urétrite se manifeste par un écoulement purulent dans 90 % des cas, du moins chez l'homme; plus rarement, la symptomatologie peut être fruste.
- *Chlamydia trachomatis* (sérotypes D à K) est le principal agent des urétrites non gonococciques. La symptomatologie apparaît en moyenne dans les 10 à 20 jours suivant le contact contaminant. Dans la moitié des cas, l'urétrite est symptomatique soit à type d'écoulement clair, soit à type de dysurie, pollakiurie ou brûlures mictionnelles; plus rarement, il existe un écoulement purulent; parfois, l'infection est asymptomatique.
- *Mycoplasma genitalium* serait responsable d'environ 15 à 25 % des urétrites non gonococciques, et serait surtout impliqué dans les urétrites récidivantes et les urétrites chroniques.
- *Ureaplasma* spp. est également responsable d'urétrite, mais son implication est plus discutée, en raison d'un portage génital féminin et masculin totalement asymptomatique.
- *Trichomonas vaginalis* est un protozoaire flagellé responsable de 5 à 15 % des urétrites non gonococciques.
- Les autres germes sont plus rarement à l'origine d'urétrites : *Haemophilus* spp., streptocoques, entérobactéries, etc.

Diagnostic bactériologique direct (Fig. 22.3)

Prélèvement

Le prélèvement urétral doit être réalisé le matin avant toute toilette, chez un patient confortablement installé (position semi-allongée). En cas d'écoulement, recueillir la goutte sur une lame porte-objet pour examen direct. Dans tous les cas, prélever avec des écouvillons « fins » et avec douceur, afin de limiter le caractère inconfortable du prélèvement. Un premier écouvillon en coton est introduit sur 1 cm pour la recherche des germes standard et la réalisation de l'examen direct (en cas d'utilisation d'un milieu de transport pour le gonocoque, réaliser un écouvillon supplémentaire pour l'examen direct). Le deuxième écouvillon, en alginate, doit être introduit sur 2 à 3 cm, en effectuant un raclage léger permettant le recueil des cellules pour la recherche des mycoplasmes par culture. Le troisième écouvillon, également en alginate avec tige en plastique, est introduit sur 2 à 3 cm et utilisé pour la recherche par amplification génique de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium*; il doit être placé en milieu de transport type saccharose phosphate (2SP), MicroTest Culture Transport System (M4-RT) ou Universal Transport Medium (UTM-RT), permettant ultérieurement l'identification de la bactérie quelle que soit la méthode utilisée.

La recherche par amplification génique de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonnorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium* peut également être réalisée sur un prélèvement de premier jet des urines par recueil de celui-ci à partir des urines de la nuit (ou par recueil du premier jet au moins 2 heures après la dernière miction).

Transport et stockage

Idéalement, le prélèvement urétral doit être réalisé au laboratoire. Si ce n'est pas le cas, les échantillons doivent être acheminés le plus rapidement possible au laboratoire. Des milieux de transport peuvent être utilisés : pour *Neisseria gonorrhoeae*, 2SP; pour *Chlamydia trachomatis* et *Mycoplasma genitalium*, 2SP ou A3 pour mycoplasmes génitaux, etc.

Le premier jet urinaire peut être conservé à +4 °C.

Démarche du diagnostic direct sur le produit pathologique

Cultures

Traitement de l'échantillon

Les échantillons doivent être techniqués le plus rapidement possible en raison de la fragilité de certains germes.

Examens microscopiques

L'examen microscopique à l'état frais, entre lame et lamelle, permet de visualiser plus facilement la présence de *Trichomonas vaginalis* en raison de ses mouvements, ou de levures.

L'examen microscopique par coloration de Gram permet de visualiser des diplocoques à Gram négatif en grains de café intra- et extracellulaires, souvent rares sur le frottis, évocateurs de *Neisseria gonorrhoeae*.

Milieux de culture

Pour la recherche de bactéries communes, ensemencer une gélose au sang (base Columbia ou trypticase-soja, enrichie de 5 % de sang de cheval ou de mouton) et une gélose type chocolat Polyvitex®; une gélose lactosée type CLED peut être ajoutée, inhibant la mobilité des *Proteus*. Incuber les géloses 48 heures au minimum.

Pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae*, ensemencer une gélose au chocolat Polyvitex® (déjà faite pour les germes communs) et une gélose chocolat avec agents inhibiteurs type VCN, VCF ou VCAT en atmosphère enrichie de 5 à 10 % de CO_2. Incuber les géloses 5 jours.

Pour les mycoplasmes génitaux, ensemencer sur milieux enrichis en sérum et extrait de levures. Il existe des milieux

Tableau 22.1 **Approche diagnostique des urétrites en fonction de la bactérie suspectée.**

	Prélèvements	**Examen microscopique**	**Culture**	**Amplification génique**	**Antibiogramme ou assimilé**
Neisseria gonorrhoeae	Écoulement ou prélèvement urétral 1er jet d'urine	Colorations de Gram ou de bleu de méthylène	Indispensable pour tester la sensibilité aux antibiotiques	Associée à la culture qui manque de sensibilité surtout s'il y a transport du prélèvement avant inoculation des géloses	Indispensable mais l'absence d'automatisation et la rareté font que la souche est de plus en plus souvent envoyée au CNR qui évalue sa sensibilité
Chlamydia trachomatis	1er jet d'urine ou prélèvement urétral	L'immunofluorescence doit être abandonnée en raison des difficultés de lecture	Réservée au CNR	Indispensable Trousse disponible	Étude des résistances réservée aux laboratoires spécialisés
Mycoplasma genitalium	Écoulement ou prélèvement urétral 1er jet d'urine.	Impossible	Très difficile Réservée aux laboratoires spécialisés	Indispensable	Étude des résistances réservée aux laboratoires spécialisés
Ureaplasma spp.	Écoulement ou prélèvement urétral ou 1er jet d'urine	Impossible	Avec quantification pathogène si $\geq 10^4$ UCC/ml (10^3 pour l'urine)		Uniquement si $\geq 10^4$ UCC/ml
Trichomonas vaginalis	Écoulement ou prélèvement urétral	État frais à faire dans le quart d'heure qui suit le prélèvement ou bien coloration au MGG	Possible mais problème de sensibilité des milieux actuellement commercialisés	Surtout s'il y a transport du prélèvement car impossibilité de faire l'état frais	Inexistant
Autres cultures standard : *Haemophilus influenzae*, streptocoque β-hémolytique	Écoulement, ou prélèvement endo-urétral	Coloration de Gram	Cultures sur différents milieux		Fonction de la culture et de l'examen direct

*UCC : unité de changement de couleur.

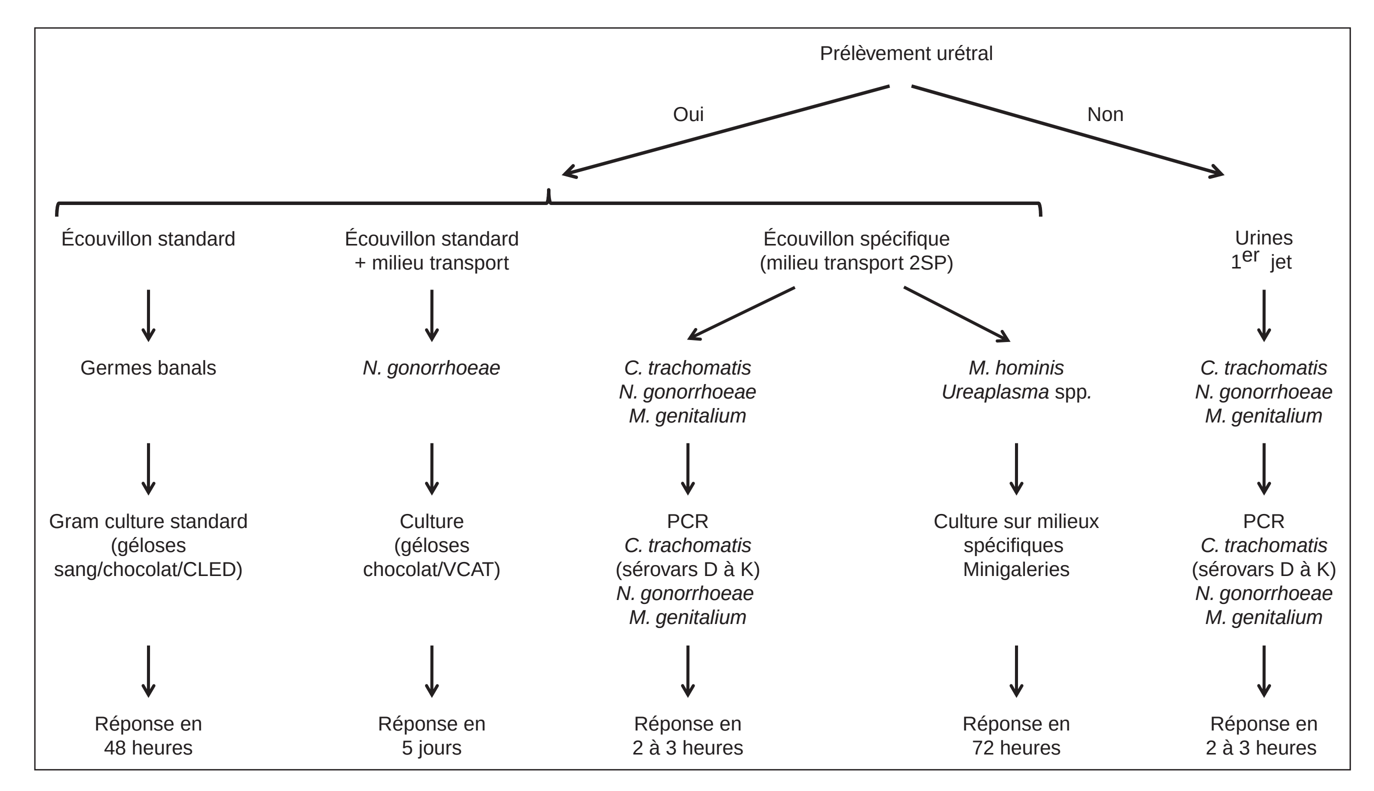


Fig. 22.3 Conduite à tenir en cas d'urétrite chez l'homme.

solides (type gélose A7) et des milieux liquides (minigalerie type Mycofast® Revolution) qui permettent à la fois l'identification, la numération et l'antibiogramme du mycoplasme. Les géloses sont incubées 48 à 72 heures et les minigaleries 24 à 48 heures. Ces milieux permettent la croissance d'*Ureaplasma* spp. et de *Mycoplasma hominis*, mais pas de *Mycoplasma genitalium*.

Pour la recherche de *Chlamydia trachomatis* et *Mycoplasma genitalium*, la culture sur milieux gélosés est impossible.

Identification

Les colonies de *Neisseria gonorrhoeae* sont de couleur grisâtre, à bords irréguliers, plus ou moins brillantes, mesurant de 0,5 à 1 mm de diamètre. *Neisseria gonorrhoeae* possède une réaction de catalase positive et d'oxydase positive. Elle acidifie le glucose, mais pas le maltose, le fructose, ni le saccharose. L'ONPG est négatif, de même que le γGT ; il n'y a pas de nitrate réductase. En pratique, les galeries biochimiques de type Api NH® (bioMérieux), Vitek NH® (bioMérieux), BBL Crystal® (Becton Dickinson) ou Neisseria 4H® (Bio-Rad) permettent l'identification de cette bactérie (voir chapitre 29).

Sur milieux gélosés, la morphologie des mycoplasmes génitaux observée au microscope (objectif 40) est caractéristique : colonies avec partie centrale plus dense et périphérie plus claire (image en « œuf au plat ») évocatrice de *Mycoplasma hominis* ; colonies denses de façon homogène (image en « oursin ») évocatrice d'*Ureaplasma* spp. L'identification des mycoplasmes génitaux par minigaleries repose sur leur résistance naturelle vis-à-vis de certains antibiotiques (Tableau 22.2). Ces minigaleries permettent également de numérer *Ureaplasma* spp. (10^3, 10^4 ou $\geq 10^5$ unités de changement de couleur par millilitre [UCC/ml]) et *Mycoplasma hominis* ($\geq 10^4$ UCC/ml). S'il y a discordance entre les résultats observés sur minigaleries et sur milieux gélosés, par exemple minigalerie positive et gélose négative, repiquer les cupules positives de la minigalerie sur milieux gélosés afin de vérifier la morphologie des colonies (voir chapitre 35).

Résultats et interprétation

La présence d'une culture polybactérienne, quantitativement peu ou moyennement abondante, est en faveur d'une colonisation urétrale.

La présence d'une culture pure ou avec nette prédominance d'une seule espèce (*Escherichia coli*, autre entérobactérie, *Pseudomonas*, etc.) est en faveur d'un processus infectieux, surtout si la culture est abondante et associée à la présence de polynucléaires.

Mycoplasma hominis et *Ureaplasma* spp. sont des commensaux des voies génitales, ce qui rend plus difficile l'appréciation de leur pathogénicité. L'aspect quantitatif est donc important à prendre en considération ; ainsi, pour *Ureaplasma* spp., le seuil de pathogénicité est $\geq 10^4$ UCC/ml pour un prélèvement urétral, et $\geq 10^3$ UCC/ml pour un premier jet d'urines.

Antibiotiques à tester

La détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques est réalisée selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM). Concernant plus spécifiquement *Neisseria gonorrhoeae*, la présence de la bêta-lactamase doit être recherchée par une technique chromogénique (sur disque

Tableau 22.2 Identification des mycoplasmes génitaux sur la base de leur résistance naturelle aux antibiotiques.

	Triméthoprime–sulfaméthoxazole	Lincomycine	Érythromycine
Ureaplasma spp.	R	R	S
Mycoplasma hominis	R	S	R

de céfinase) ; la bêta-lactamase confère la résistance aux amino-, carboxy- et acyluréido-pénicillines ; l'association à un inhibiteur de bêta-lactamase restaure l'activité de ces pénicillines. Une baisse de sensibilité vis-à-vis de la pénicilline et/ou des céphalosporines de troisième génération a également été décrite. En pratique, l'antibiogramme est réalisé sur milieu gélosé type chocolat Polyvitex® selon les recommandations CA-SFM de 2013 (l'EUCAST ne propose pas encore les concentrations et/ou diamètres critiques pour cette bactérie), en testant la sensibilité à la pénicilline G, au céfixime, à la ceftriaxone, à la ciprofloxacine (ou l'ofloxacine), à la spectinomycine, à la tétracycline et l'azithromycine, soit par la technique E-test® (en particulier pour les bêta-lactamines et les quinolones pour lesquelles il peut exister une baisse de sensibilité), soit par la technique des disques.

La détermination de la sensibilité des mycoplasmes peut être réalisée en milieu liquide en utilisant les minigaleries. Selon les kits utilisés, différentes molécules peuvent être testées : érythromycine, clindamycine, tétracycline, lévofloxacine, moxifloxacine.

Biologie moléculaire

- *Chlamydia trachomatis* : différentes techniques d'amplification génique sont actuellement commercialisées et ont supplanté les techniques « maison ». Elles sont souvent couplées à la recherche de *Neisseria gonorrhoeae*, plus rarement à celle de *Mycoplasma genitalium*. Elles sont très sensibles et très spécifiques, mais relativement onéreuses. Le contrôle après traitement ne doit pas être réalisé avant 6 semaines après l'arrêt de l'antibiotique.
- *Neisseria gonorrhoeae* : la mise en évidence de *Neisseria gonorrhoeae* peut également être réalisée par PCR. Différentes techniques d'amplification génique sont actuellement commercialisées et ont supplanté les techniques « maison ». Elles sont souvent couplées à la recherche de *Neisseria gonorrhoeae*, plus rarement à celle de *Mycoplasma genitalium*.
- *Mycoplasma genitalium* : différentes techniques d'amplification génique sont disponibles, soit en version techniques « maison », soit commercialisées ; parmi celles-ci, certaines permettent également la détection de *Chlamydia trachomatis* et de *Neisseria gonorrhoeae*.

La présence de *Chlamydia trachomatis*, de *Neisseria gonorrhoeae* ou de *Mycoplasma genitalium* signe l'infection, qu'elle soit symptomatique ou non.

Diagnostic bactériologique indirect

La sérologie n'a aucun intérêt pour le diagnostic des urétrites à *Chlamydia trachomatis* chez l'homme.

Prostatites, épididymites et orchiépididymites

Rappel anatomoclinique et pathogenèse

La prostatite correspond à l'inflammation de la glande prostatique, qui peut se présenter sous quatre formes : la prostatite aiguë bactérienne, la prostatite chronique bactérienne, la prostatite chronique non bactérienne et la prostatite asymptomatique. Seules les deux premières formes ont leur place dans ce chapitre, en sachant qu'elles ne représenteraient que 10 % de l'ensemble des prostatites. Le principal mode de contamination est la voie canalaire, soit par voie descendante à partir de la vessie, soit par voie ascendante à partir de l'urètre. Les manœuvres instrumentales (sondage vésical, endoscopie, biopsie, chirurgie, etc.) sont des facteurs favorisant l'infection.

Les étiologies bactériennes varient en fonction du caractère nosocomial et/ou iatrogène de la prostatite : *Escherichia coli* est la première cause, les autres entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* sont plus rarement en cause, de même que les entérocoques et les mycoplasmes génitaux (*Ureaplasma* spp., *Mycoplasma genitalium*).

L'épididymite est l'inflammation de l'épididyme, qui s'étend parfois au testicule, constituant alors l'orchiépididymite (l'orchite seule est rare et se voit principalement au cours des oreillons). Le mode de contamination est la voie canalaire ascendante. Les germes en cause sont ceux déjà cités dans le cadre des urétrites (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma* spp.) et des prostatites (*Escherichia coli*, autres entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*), ainsi que quelques germes plus rarement impliqués (*Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus*, etc.).

Diagnostic bactériologique direct

Prélèvements

Plusieurs prélèvements peuvent être réalisés, selon la symptomatologie :

- le prélèvement urétral, comme indiqué dans le cas de l'urétrite (voir ci-dessus) ;
- le recueil du premier jet urinaire, qui peut être une alternative au prélèvement urétral pour la recherche de *Chlamydia* ;
- le recueil des sécrétions prostatiques après massage prostatique. En pratique, après vidange vésicale, réaliser un massage de la prostate par toucher rectal, et recueillir les éventuelles sécrétions s'écoulant par l'urètre. Le massage prostatique est de moins en moins pratiqué pour les prélèvements. S'il n'y a pas de sécrétions visibles, demander au patient d'uriner et recueillir le début de miction ;
- la spermoculture, qui peut également être contributive.

Enfin, dans le cas d'une constitution d'un abcès, le recours à la chirurgie est fréquent. Il est important de demander au chirurgien d'adresser au laboratoire un échantillon de pus.

Démarche du diagnostic direct sur le produit pathologique

Pour la recherche de bactéries communes, de *Neisseria gonorrhoeae*, des mycoplasmes génitaux et de *Chlamydia trachomatis*, voir ci-dessus le paragraphe « Urétrites ».

Rôle du laboratoire dans la surveillance de l'infection

Les maladies sexuellement transmises ne sont pas à déclaration obligatoire. Il est donc important, en raison de leur recrudescence, de disposer d'informations épidémiologiques actualisées, tant sur le plan du nombre de cas que de l'évolution de la résistance aux antibiotiques. C'est pourquoi les laboratoires publics et privés peuvent participer à différents réseaux de surveillance nationaux pilotés par l'Institut national de veille sanitaire (InVS) en collaboration avec les CNR correspondants. Il s'agit du Réseau national des gonocoques (RENAGO), du Réseau national des *Chlamydiae* (RENACHLA), et du Réseau de surveillance de la syphilis, auquel on peut associer la surveillance des anorectites à *Chlamydia trachomatis* pilotée par le CNR.

Pour en savoir plus

Bébéar C, de Barbeyrac B, Pereyre S, et al. Mycoplasmes. In : Freney J, Leclercq R, Renaud F, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2007.

Clyti E, Pradinaud R. Donovanose. In : Encycl Med Chir (Elsevier, Paris). Maladies infectieuses ; 2004. p. 5. 8-020-A-10.

de Barbeyrac B, Bébéar CM, Bébéar C. C. Chlamydia. In : Freney J, Leclercq R, Renaud F, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2007.

Dominique S, Delmas V, Horpitean V, et al. Infections génitales masculines. Encycl Med Chir (Elsevier, Paris). Maladies infectieuses ; 2004. 8-003-I-20.

Haute autorité de santé. Argumentaire – Modification de la nomenclature des actes de biologie médicale pour les actes de recherche du Treponema pallidum (bactérie responsable de la syphilis) ; mai 2015.

REMIC – Référentiel en Microbiologie Médicale. Société française de microbiologie ; 2015.

Adresses utiles

Centre national de référence des *Chlamydiae*
Dr Bertille de Barbeyrac
USC INRA EA 3671, Infections humaines à mycoplasmes et à chlamydiae,
Université de Bordeaux
146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex
Tél. : 05 57 57 16 25
E-mail : bertille.de.barbeyrac@u-bordeaux2.fr

Centre national de référence des gonocoques
Dr Agathe Goubard
Institut Alfred Fournier
25, bd Saint Jacques, 75014 Paris
Tél. : 01 40 78 26 25
E-mail : agathe.goubard@institutfournier.org

Centre national de référence des gonocoques – Laboratoire associé
Pr Emmanuelle Cambau
Tél. : 01 49 95 65 54
E-mail : emmanuelle.cambau@lrb.aphp.fr
Dr Béatrice Berçot
Tél. : 01 49 95 67 99
E-mail : beatrice.bercot@lrb.ap-hop-paris.fr
Laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène
Groupe hospitalier Saint-Louis-Lariboisière-Fernand Widal
2, rue Ambroise Paré, 75018 Paris cedex 18

Centre national de référence de la syphilis
Pr Nicolas Dupin
Tél. : 01 58 41 18 49
nicolas.dupin@cch.aphp.fr
Dr Philippe Grange
Tél. : 01 44 41 25 60
E-mail : philippe.grange@cch.aphp.fr
Laboratoire de dermatologie, bâtiment Gustave Roussy
Hôpital Cochin
8, rue Méchain, 75014 Paris

Infections génitales chez la femme

A. Tazi, C. Plainvert, C. Poyart

PLAN DU CHAPITRE

Introduction

Les nombreux antibiogrammes réalisés par excès sur des bactéries commensales vaginales conduisent à des dépenses de santé inutiles et à des traitements inadaptés finalement préjudiciables à l'état de santé des patientes. Ces antibiothérapies ne soulagent pas les patientes et induisent des pathologies vulvovaginales et des troubles digestifs parfois majeurs. En outre, elles favorisent l'émergence dans les flores vaginales, comme dans les autres flores naturelles, de bactéries résistantes aux antibiotiques, en particulier actuellement d'entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE).

Le diagnostic des infections génitales nécessite :

- une collaboration entre le médecin prescripteur et le biologiste ;
- des procédures de prélèvements précises permettant d'obtenir des échantillons de qualité irréprochable ;
- une parfaite connaissance de l'écologie microbienne normale du vagin ;
- la nature des pathologies infectieuses des voies génitales féminines et les critères d'interprétation rigoureux et limités à ces pathologies.

Rappel anatomique

Chez la femme, le vagin, l'utérus (col + corps) et le conduit tubaire constituent un canal continu de la vulve à la cavité péritonéale (Fig. 23.1). L'appareil génital féminin est composé de deux secteurs anatomiques qui diffèrent notablement quant à la microbiologie de leurs cavités. Le premier secteur comporte la vulve, le vestibule, le vagin et l'exocol. Il est largement colonisé par les flores commensales. Inversement, le second secteur, composé de l'endocol, de la cavité utérine, de la cavité tubaire et de la cavité péritonéale, est stérile. Ces deux secteurs sont séparés par le col de l'utérus (tiers inférieur de l'utérus) qui peut être considéré comme un véritable « verrou microbiologique » très efficace contre l'ascension des bactéries cervicovaginales. L'effet mécanique « chasse d'eau » de la glaire cervicale et des liquides biologiques qui s'écoulent de l'utérus vers le vagin, la sécrétion locale d'enzymes antibactériennes et l'extravasation et la production locale d'immunoglobulines constituent une barrière infranchissable par les bactéries commensales vaginales. Seuls trois agents sexuellement transmis, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* et probablement *Mycoplasma genitalium*, possèdent des propriétés de virulence qui leur confèrent la capacité de franchir la barrière cervicale.

Le milieu vaginal est composé d'une phase liquide, riche en eau et en substances d'origine plasmatique, et des constituants de la glaire cervicale. Les éléments solides et figurés du milieu vaginal sont des cellules vaginales superficielles exfoliées en grand nombre, des leucocytes en nombre modéré résultant surtout de la réponse inflammatoire d'un ectropion plus ou moins étendu, et des bactéries. La concentration bactérienne varie de 10^5 à 10^{12} bactéries par gramme de sécrétions vaginales selon la nature de la flore.

La flore bactérienne dominante est composée d'une diversité de lactobacilles. Les espèces les plus souvent rencontrées sont *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* et *L. iners*, mais de très nombreuses espèces différentes continuent à être décrites. La nature et la composition en lactobacilles (1 à 4 espèces généralement) varient dans le temps et en fonction des conditions physiologiques (puberté, grossesse, ménopause, etc.). La concentration usuelle des lactobacilles en l'absence de pathologie est située entre 10^5 et 10^8 bactéries par gramme de sécrétions vaginales. À l'examen d'un frottis des sécrétions vaginales grossièrement étalées sur une lame colorée par la coloration de Gram, on observe le plus souvent (grossissement $\times 1000$) 10 à 100 lactobacilles par champ microscopique, avec des extrêmes situés de 1 à 1000 bactéries par champ microscopique. Parallèlement

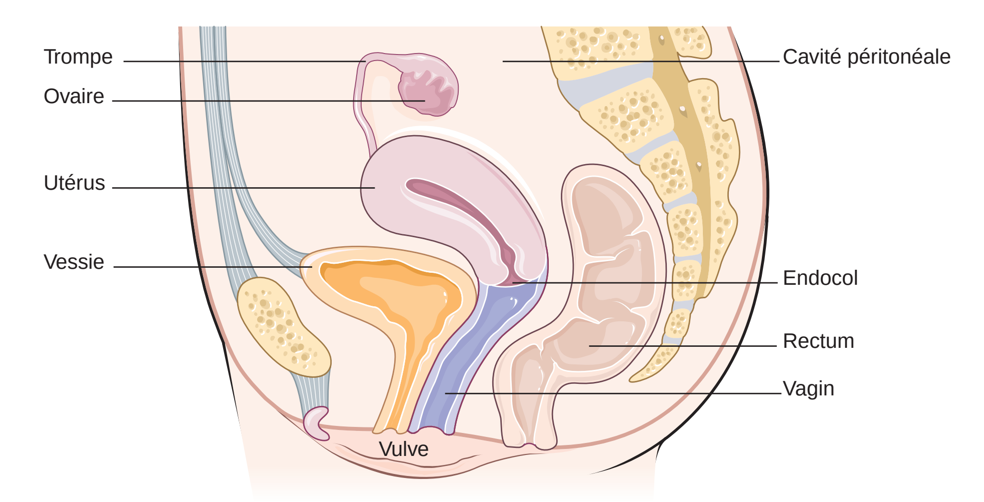


Fig. 23.1 Anatomie et microbiologie de l'appareil génital féminin. La vulve, le vestibule, le vagin et l'exocol sont colonisés par 10^5 à 10^8 bactéries par gramme de sécrétions génitales. Les lactobacilles sont divers et constituent la flore dominante. D'autres bactéries habituellement commensales de la flore digestive et de l'oropharynx colonisent physiologiquement le milieu vaginal et l'exocol. La cavité utérine et tubaire et le péritoine pelvien sont stériles.

à cette flore dominante, la flore vaginale minoritaire comporte une grande diversité d'espèces dont certaines n'ont pas encore été nommées. Régulièrement, depuis l'avènement de la biologie moléculaire et le développement des techniques de métagénomique et de séquençage à haut débit, les travaux sur l'écologie microbienne du vagin permettent la mise en évidence de ces espèces nouvelles – exemple récent, les espèces du genre *Atopobium* – qui enrichissent une liste déjà longue de bactéries commensales vaginales et dont la plupart ne sont pas ou difficilement identifiables par les méthodes de bactériologie classique après 48 heures de culture. Néanmoins, parmi elles, certaines espèces commensales doivent être connues et détectées en raison de leur intérêt médical. En effet, elles sont régulièrement impliquées dans des pathologies du tractus génital ou compliquent les situations gynécologiques ou obstétricales à risque infectieux. Issue des flores naturelles digestives et des flores oropharyngées de l'homme (Tableau 23.1), cette flore polymorphe et en constante évolution est peu développée à l'état physiologique et généralement non visible à la coloration de Gram (≤ 10^4 bactéries par gramme de sécrétions vaginales), bien que repérable sur les milieux de culture. Cette diversité des tableaux microbiologiques est observable à la coloration de Gram, moyen le plus simple et le plus efficace en pratique médicale pour observer l'écologie microbienne du milieu vaginal.

Les conclusions pratiques sont les suivantes. La flore normale cervicovaginale est abondante et variée. Dans les prélèvements vaginaux, il est donc usuel d'observer un polymorphisme. La présence de bactéries pathogènes spécifiques (*N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et probablement *M. genitalium*) est toujours anormale. En revanche, la présence de pathogènes opportunistes (groupes II et III, Tableau 23.1) doit être interprétée en fonction de la situation clinique des patientes, de la nature des bactéries et de leur rôle connu dans certains processus infectieux. Le haut appareil est stérile ; par conséquent, tout prélèvement fait à ce niveau sera facile à interpréter. Néanmoins, la richesse de la flore vaginale expose à un risque majeur de contamination de ces prélèvements lors de leur exécution par voie basse.

Tableau 23.1 Populations bactériennes constituant la flore vaginale.

La flore vaginale normale est très diverse. Elle est constituée de 10^5 à 10^8 bactéries par gramme de sécrétions vaginales. Les bactéries d'intérêt médical peuvent être groupées en trois populations définies en fonction de leur origine écologique.
Groupe I. La flore bactérienne de portage habituel (flore dominante) est spécifiquement adaptée à la cavité vaginale : elle est essentiellement constituée de lactobacilles (flore de Doderlein) de 1 à 4 espèces par femme. Classiquement observables à la coloration de Gram sous la forme de gros bacilles à Gram positif, certaines espèces ont une apparence de bacilles à Gram positif plus fins voire coccoïdes en courtes chaînettes faisant penser à tort à des corynébactéries ou à des streptocoques.
Groupe II. La flore bactérienne issue de la flore digestive colonise souvent les voies génitales féminines. Elle est observée chez 2 à 80 % des femmes selon les bactéries impliquées. Elle est constituée des éléments suivants : – streptocoques, dont *Streptococcus agalactiae*, et *Enterococcus* spp. – entérobactéries, dont *Escherichia coli* mais aussi *Proteus*, *Morganella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, etc., en particulier chez les patientes ayant reçu de multiples antibiothérapies – bacilles à Gram négatif aérobies stricts chez les patientes ayant reçu de multiples antibiothérapies ou ayant été colonisées par des produits contaminés : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, etc. – staphylocoques coagulase + et – – bactéries anaérobies (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Mobiluncus*, etc.) – *Gardnerella vaginalis* – *Atopobium vaginae* – mycoplasmes, en particulier *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*
Groupe III. Des hôtes usuels de la flore oropharyngée colonisent plus exceptionnellement la cavité vaginale. Cela est observé chez 0,1 à 2 % des femmes selon les bactéries en cause. Toutes les bactéries oropharyngées peuvent être isolées de la cavité vaginale, mais le plus souvent il s'agit de : – *Haemophilus* spp. – *Streptococcus pyogenes* – *Streptococcus pneumoniae* et autres streptocoques *viridans* – méningocoques et autres *Neisseria*, *Branhamella*, *Capnocytophaga*

Pathogenèse

Pathologies infectieuses cervicovaginales

L'examen bactériologique de routine des sécrétions vaginales a pour but d'effectuer le diagnostic des quatre pathologies infectieuses suivantes : mycoses, infections à *Trichomonas vaginalis*, vaginoses bactériennes et vaginites bactériennes.

Mycoses

Les mycoses résultent le plus souvent de perturbations du milieu vaginal qui autorisent une prolifération de levures dont le portage vaginal est de 15 à 20 % dans la population générale. Ces perturbations sont le plus souvent des facteurs liés à l'hôte (diabète, hygiène, sexualité, antibiothérapie, contraception inadaptée, perturbations hormonales, sida et autres pathologies sous-jacentes immunoperturbatrices, etc.). Les raisons des récidives de la pathologie sont le plus souvent non identifiables. Les agents en cause les plus fréquents sont *Candida albicans* (85 à 90 % des cas), *Candida glabrata* (femme enceinte), *Candida tropicalis* et parfois *Candida balanitis*. Quelle que soit l'espèce, la prolifération fongique se manifeste par une symptomatologie d'allergie (érythème cutané de type « eczéma » avec prurit, hyperdesquamation cellulaire, œdème, etc.) et l'absence de réponse inflammatoire de l'hôte (frottis vaginal non inflammatoire).

Vulvovaginite à *Trichomonas vaginalis*

Trichomona vaginalis est un parasite transmis par voie sexuelle et responsable de vulvovaginites se manifestant 4 à 28 jours après exposition. C'est le seul agent infectieux capable d'entraîner une inflammation d'origine infectieuse de la muqueuse vaginale chez la femme en période d'activité ovarienne ayant une trophicité vaginale normale (frottis vaginal inflammatoire : leucocytes en grand nombre dans les sécrétions vaginales).

Vaginoses bactériennes

Des syndromes et des tableaux microbiologiques comparables à ce que l'on appelle actuellement « vaginoses bactériennes » ont été décrits dès la fin du XIXe siècle et au début du XXe siècle. Les vaginoses bactériennes représentent 40 à 50 % des leucorrhées. Ces perturbations de l'écologie microbienne normale du milieu vaginal induisent une prolifération bactérienne polymorphe (> 10^8/g de sécrétions vaginales) de bactéries usuellement présentes dans le vagin (Tableau 23.2). Le nombre de bactéries est 100 à 100 000 fois plus élevé que ce que l'on observe dans une flore vaginale normale.

De nombreux facteurs liés à l'hôte, en partie non identifiés, sont à l'origine des vaginoses [1]. Parmi eux, on peut citer une augmentation du risque observé chez les patientes de niveau socio-économique bas, chez les tabagiques, chez les femmes qui prennent 4 bains ou plus par semaine (*odds ratio* [OR] = 2,7), chez les patientes qui pratiquent la douche vaginale régulièrement (OR = 3,6), lorsqu'il existe une infection sexuellement transmissible (IST) associée. Inversement, le risque est diminué chez les patientes qui prennent une contraception orale (OR = 0,5), des vitamines/suppléments nutritionnels (OR = 0,4) ; c'est dire l'impact probable de l'hygiène de vie.

Tableau 23.2 **Principales bactéries de la flore vaginale normale retrouvées en grande quantité* dans les tableaux de vaginose et prévalence**.**

Bactéries	Flore normale	Vaginoses
Prevotella	40 %	91 %
Peptostreptococcus	60 %	80 %
Gardnerella vaginalis	11–69 %	90 %
Mobiluncus curtisii et *mulieris*	<6 %	14–96 %
Mycoplasma hominis	0–22 %	24–75 %
Ureaplasma urealyticum	50 %	50 %
Mycoplasma genitalium	10 %	<10 %
Atopobium vaginae	0–8 %	40–70 %
Mais aussi *Streptococcus acidominus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus morbillorum*, *Atopobium rimae*, *Bifidobacterium urinalis*, *Leptotrichia amnionii*, *Sneathia sanguinegens*, etc.		

* Prolifération > 10^8/g, soit 100 à 100 000 fois la concentration normale avec une diminution des lactobacilles.
** Pour une patiente donnée, ni la présence, ni la nature des bactéries ne permettent le diagnostic de vaginose. Le normal et le pathogène se différencient uniquement, du point de vue bactériologique, par l'abondance des bactéries observées à l'examen direct après coloration de Gram.

Les flores de vaginose s'accompagnent d'une diminution réelle ou relative des lactobacilles et d'une production de métabolites bactériens allergisants ou irritants (putrescine, cadavérine, acide α-amino-n-butyrique, triméthylamine, succinates, butyrates, propionates, etc.). Comme au cours de la mycose, la symptomatologie est la conséquence d'une réaction allergique. Il n'y a pas de réponse inflammatoire de l'hôte (frottis vaginal non inflammatoire : peu de leucocytes dans les sécrétions vaginales). Le diagnostic positif repose sur au moins trois des critères suivants : un aspect clinique caractéristique, un test à la potasse positif, un pH vaginal au-dessus de 4,5, à l'examen direct aspect des cellules indicatrices dites *clue cells*.

Vaginites bactériennes

Certaines bactéries commensales des muqueuses digestives ou oropharyngées colonisent régulièrement la flore génitale (groupes II et III, Tableau 23.1). Certaines opportunités (muqueuses vaginales immatures chez la petite fille, IST, ectropion étendu du col, trophicité vaginale altérée, notamment après la ménopause, traitements antibiotiques et hormonaux, etc.) et des propriétés invasives de certaines souches bactériennes favorisent la prolifération quasi exclusive d'une seule espèce bactérienne (le plus souvent *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, bactéries du groupe III) et la disparition de la flore du groupe I (Tableau 23.1). L'agression des muqueuses se traduit par des lésions inflammatoires (frottis vaginal inflammatoire : leucocytes en grand nombre dans les sécrétions vaginales). La transmission par voie sexuelle de ces bactéries devient

alors possible. Il s'agit d'un tableau clinique et microbiologique qui concerne surtout la petite fille et la femme en privation hormonale. La réalité des vaginites bactériennes chez la femme en période d'activité génitale ou pendant la grossesse n'est pas prouvée. Il faut différencier effectivement cette entité du « portage génital » qui ne s'accompagne pas d'un tableau infectieux cervicovaginal et qui s'accompagne d'une cytologie vaginale normale.

Ulcérations génitales

Chez la femme, les lésions génitales passent souvent inaperçues mais peuvent être identifiées lors d'un prélèvement génital. L'agent pathogène le plus souvent en cause est l'*herpes simplex virus* (HSV), mais des bactéries peuvent également être responsables de ces IST, en particulier *Treponema pallidum* (agent de la syphilis), *C. trachomatis* biovar *lymphogranuloma venereum* (LGV), *Haemophilus ducreyi* (agent du chancre mou) et *Klebsiella granulomatis* (agent de la donovanose).

Portage vaginal

Le portage vaginal est une problématique quasi exclusive chez la femme enceinte en raison des complications maternelles, fœtales et néonatales graves qui peuvent survenir à la rupture des membranes ou à l'ouverture du col avant terme ou lors de l'accouchement [3]. Ces bactéries peuvent être nommées « bactéries vaginales à haut risque infectieux » (BVHRI) pour la mère et le nouveau-né. Le risque le mieux documenté concerne le portage de *S. agalactiae*, *E. coli*, *Haemophilus* spp., *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes*.

Pathologies infectieuses de l'utérus et des trompes

Les pathologies du haut appareil génital se divisent en endocervicites et infections utéro-annexielles (endométrites + salpingites).

Endocervicites

Trois espèces bactériennes – *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* biovar *Trachoma* sérovars D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J et K) et *M. genitalium* – sont capables de franchir la barrière cervicale et d'infecter les cryptes glandulaires, entraînant une endocervicite. Acquises par voie sexuelle, elles infectent l'endocol et parallèlement l'urètre.

Infections utéro-annexielles

Ces infections peuvent succéder à une endocervicite à *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium*. Elles peuvent également être liées à des bactéries vaginales des groupes II et III (Tableau 23.1) qui, dans certaines situations à risque où le verrou microbiologique constitué par le col est altéré, peuvent gagner la cavité utérine pour s'y multiplier et créer une endométrite ou une pyométrie, voire gagner la cavité tubaire, créant une salpingite, et le péritoine pelvien, induisant une pelvipéritonite. Ces infections utéro-annexielles surviennent lorsque la patiente a une pathologie sous-jacente (malformations utérines, polype accouché par le col, cancer de l'endomètre), ou succèdent à des manœuvres gynécologiques par voie basse (stérilet, hystéroscopie, hystérosalpingographie, etc.) ou dans le post-partum ou le postabortum.

Diagnostic bactériologique

Prélèvements

La nature des prélèvements à examiner dépend du diagnostic clinique (Tableau 23.3).

Le bactériologiste dispose des instruments suivants : spéculums de différentes tailles, pinces longuettes, écouvillons stériles secs ou avec milieu de transport (en coton, en plastique, en alginate, etc.), compresses stériles, flacon d'antiseptique unidose (chlorhexidine, Bétadine®), eau salée stérile unidose, gants ou doigtiers. La patiente est en position gynécologique.

Prélèvements vulvaires

On utilise des écouvillons avec milieu de transport ou on imbibe les écouvillons avec de la solution saline à 0,9 % stérile. À l'aide de ces écouvillons, on prélève en frottant sur les lésions.

Prélèvements dans le vagin, sur l'exocol et dans l'endocol

L'utilisation d'un spéculum n'est actuellement plus nécessaire dans beaucoup de circonstances cliniques. En effet, le prélèvement vaginal sans spéculum ou l'autoprélèvement vaginal permettent un recueil des sécrétions tout à fait satisfaisant pour une analyse bactériologique de qualité afin d'étayer le diagnostic des pathologies infectieuses vaginales, de rechercher *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium* par les tests d'amplification des acides nucléiques (TAAN) et pour dépister les BVHRI. En revanche, lorsque le prélèvement d'endocol est justifié (endométrites, salpingites), la mise en place du spéculum est nécessaire.

Mise en place du spéculum

On choisira la taille du spéculum en fonction de l'âge, de la parité de la femme. On maintient les petites lèvres écartées avec deux doigts de la main gauche. En évitant la zone sous-urétrale sensible et le clitoris, on introduit le spéculum en appuyant sur la fourchette, soit perpendiculairement à l'axe de la vulve directement dans le plan de la cavité vaginale, soit parallèlement à l'axe de la vulve en tournant de 90° tout en l'enfonçant pour le ramener dans le plan de la cavité vaginale. Après introduction sur 5 à 6 cm, l'ouverture légère du spéculum permet un contrôle visuel de sa progression vers le sacrum selon un axe de 45° par rapport au plan de la table. Dès visualisation du col, on écarte avec la vis les deux valves qui se placent, l'une dans le cul-de-sac antérieur, l'autre dans le cul-de-sac postérieur, exposant correctement le col. Lorsque le col n'est pas visible, il faut le rechercher ailleurs, plus haut sous la symphyse si l'utérus est rétroversé, ou plus profondément en prenant un spéculum plus long. Lorsque le spéculum est bien en place, il convient d'être bien éclairé pour faire des prélèvements convenables.

Tableau 23.3 **Nature des prélèvements génitaux à réaliser chez la femme en fonction du diagnostic clinique.**

Diagnostic clinique	Siège du prélèvement	But de l'examen
Lésions vulvaires	Prélèvement vulvaire	Recherche de : – levures – staphylocoques – streptocoques
Atteinte vaginale et/ou exocervicale	Prélèvement vaginal et/ou exocervical	Étayer les diagnostics suivants : – mycose – infection à *Trichomonas vaginalis* – vaginose bactérienne – vaginite bactérienne
Dépistage systématique au cours de la grossesse	Prélèvement vaginal et/ou exocervical	Recherche de : – *S. agalactiae* – BVHRI
Endocervicite	Prélèvement endocervical et prélèvement vaginal pour TAAN (à coupler avec un prélèvement d'urine ou urétral)	Recherche de : – *Neisseria gonorrhoeae* – *Chlamydia trachomatis* – *Mycoplasma genitalium*
Endométrite, pyométrie	Prélèvement endocervical et vaginal pour les TAAN si suspicion d'IST Prélèvement endo-utérin : – stérilet – produit de curetage – produits d'aspiration – biopsie d'endomètre – pus d'évacuation des pyométries	Recherche de : – si risque d'IST : idem endocervicite – si circonstances cliniques à risque (stérilet, investigation endo-utérine, postpartum, postabortum) : toutes les bactéries des groupes II et III (Tableau 23.1) – Biopsie d'endomètre : à la demande, recherche de bacille de Koch
Salpingites et suppurations pelviennes	Prélèvement endocervical strict et prélèvement vaginal pour les TAAN Prélèvement endo-utérin Prélèvement tubaire Prélèvements péritonéaux	Recherche de : – *Neisseria gonorrhoeae* – *Chlamydia trachomatis* – *Mycoplasma hominis* et *genitalium*, *Ureaplasma* spp. – toutes les bactéries des groupes II et III (Tableau 23.1)

BVHRI : bactéries vaginales à haut risque infectieux ; IST : infections sexuellement transmissibles ; TAAN : tests d'amplification des acides nucléiques.

Prélèvements dans le vagin

Les prélèvements vaginaux se font là où la femme se plaint, sur les lésions observées ou là où les sécrétions sont anormales, avec des écouvillons en coton stériles, en ramenant la plus grande quantité possible de sécrétions. Si les lésions sont près du col, il est souhaitable de « moucher » le col avant de prélever pour ne pas charger l'écouvillon de la glaire cervicale qui ne reflète pas bien le milieu vaginal.

En l'absence de lésions patentes de la muqueuse – ce qui est souvent le cas –, il faut charger l'écouvillon d'un maximum de sécrétions soit en prélevant sans spéculum dans le vestibule puis dans la première partie du vagin, soit au retrait du spéculum lorsque les parois antérieure et postérieure du vagin s'appliquent l'une contre l'autre. L'idéal est de réaliser deux écouvillons. Avec l'un des deux, on effectue un étalement grossier sur une lame que l'on fixe avec un fixateur cytologique en bombe, puis on adresse la lame dans un porte-lame si le prélèvement doit être transporté.

Autoprélèvement vaginal

L'autoprélèvement vaginal est bien accepté par les patientes, en particulier lorsqu'elles se déplacent au laboratoire. Cette méthode de prélèvement peut être utilisée pour le diagnostic de vaginose, le dépistage de *S. agalactiae* ou de *C. trachomatis*. Une note explicative est remise à la patiente (Fig. 23.2).

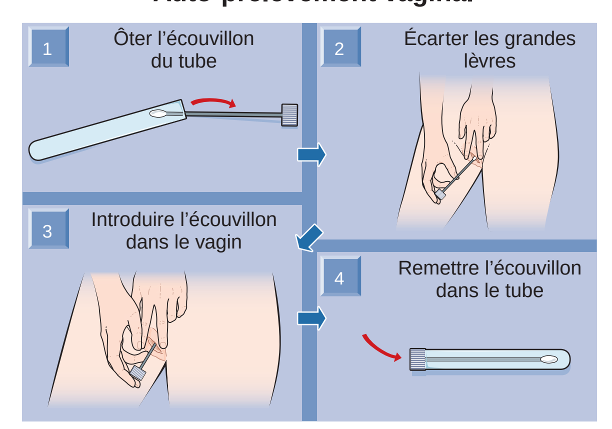


Fig. 23.2 Autoprélèvement vaginal. Il peut être utilisé pour le dépistage de la vaginose bactérienne, ou de *S. agalactiae* ou de *C. trachomatis* (diagnostic par tests d'amplification des acides nucléiques [TAAN]). Ici, la fiche remise aux femmes enceintes dans le Nord-Pas-de-Calais pour le dépistage de la vaginose bactérienne.

La femme dispose d'un écouvillon en tube stérile. Après avoir enlevé l'écouvillon du tube, en position debout, elle introduit l'écouvillon dans le vagin en écartant les grandes lèvres, puis elle remet l'écouvillon dans le tube. S'il s'agit d'écouvillon avec milieu de transport, un seul écouvillon est

suffisant ; sinon, deux écouvillons secs peuvent être réalisés, l'un pour l'état frais et la coloration de Gram, l'autre pour les cultures.

Prélèvements dans l'endocol

Ce prélèvement est rarement réalisé correctement, ce qui rend relatif le résultat des études évaluant ses performances. Il s'agit pourtant du seul prélèvement endo-utérin d'accès facile permettant d'obtenir des informations au cours des infections utéro-annexielles dues aux bactéries opportunistes d'origine vaginale. Il faut, avant tout, faire un nettoyage soigneux de l'exocol à l'aide d'une pince longuette et d'une compresse imbibée de chlorhexidine ou Bétadine® solution vaginale. Laisser agir une minute puis faire une deuxième application et, après une minute, rincer avec une compresse imbibée de sérum physiologique. Cette désinfection est absolument primordiale pour que le prélèvement d'endocol soit informatif, dès lors qu'il s'agit d'étayer le diagnostic d'une infection utéro-annexielle ou d'une chorioamniotite dans les situations à risque (stérilet, postpartum, etc.). En effet, les bactéries responsables de ces infections hautes sont des commensales du vagin ; toute contamination vaginale fausse le résultat. On introduit l'écouvillon stérile jusque dans la cavité fusiforme de l'endocol et, par un frottement léger et prolongé, on ramène de la glaire cervicale et des cellules endocervicales. Il est indiqué de faire plusieurs prélèvements, l'un avec un écouvillon-coton ou un écouvillon de nylon floqué avec milieu de transport pour la recherche des bactéries d'origine vaginale et de *N. gonorrhoeae* par culture ; l'autre avec un écouvillon en Dacron® pour la recherche de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium* par les TAAN. Des systèmes commercialisés comprenant écouvillon fin et milieu de transport pour la recherche simultanée de ces trois pathogènes par les TAAN sont également disponibles. Si une recherche de mycoplasmes par culture est nécessaire (infections utéro-annexielles), il faudra utiliser un troisième écouvillon que l'on déchargera dans des milieux de transport spécifiques.

Prélèvements urétraux

En enlevant le spéculum, il arrive qu'une goutte de pus s'écoule du méat urétral. Cette goutte ou les gouttes provenant de l'urètre ou des glandes de Skene obtenues par massage rétrosymphysaire sont recueillies sur un écouvillon pour recherche de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et des mycoplasmes.

S'il existe des signes cliniques ou des facteurs de risque d'IST, il est toujours indiqué de faire un prélèvement dans le canal urétral en introduisant sur environ 1 cm un petit écouvillon-coton pour la recherche de *N. gonorrhoeae* et de mycoplasmes, puis un petit écouvillon Dacron® pour la recherche de *C. trachomatis*. Ce prélèvement doit être fait si possible au moins une heure après la dernière miction et toujours avant le premier jet d'urine. Ce prélèvement peut être associé à, ou remplacé par un prélèvement d'urine si on utilise des TAAN comme moyen diagnostique. Dans ce dessein, les 10 à 20 premiers millilitres de la miction peuvent être prélevés à tout moment si la patiente n'a pas uriné depuis au moins 2 heures.

Autres prélèvements

Prélèvements du haut appareil génital

Le gynécologue pourra adresser au laboratoire de bactériologie d'autres prélèvements obtenus par voie basse, tels que stérilet, biopsie d'endomètre, produit de curetage, évacuation de pyométrie, produit de ponction du cul-de-sac de Douglas (culdocentèse). L'analyse correcte de ces prélèvements exige une antisepsie rigoureuse du col (application large d'un antiseptique en deux temps pendant au moins 2 minutes) pour éviter les contaminations cervicovaginales. Le gynécologue réalise en outre des prélèvements par voie haute par cœlioscopie (prélèvements tubopéritonéaux) ou par laparotomie.

Prélèvements à l'orifice de la glande de Bartholin

Il convient de désinfecter la région péri-orificielle, puis de recueillir le pus qui s'écoule après une pression douce sur la glande. Le pus peut également être recueilli lors de l'intervention pour bartholinite.

Prélèvements au niveau d'une ulcération génitale

Après repérage de l'ulcération, on prélève d'abord par écouvillonnage (recherche de levures, *S. pyogenes* et *S. aureus*) puis par grattage avec un vaccinostyle après avoir débarrassé la lésion des tissus nécrosés. Les sérosités qui apparaissent après grattage sont prélevées pour cultures et examen microscopique à fond noir pour le diagnostic de syphilis. En dehors de la syphilis, il ne faut pas méconnaître la première cause des ulcérations génitales, les virus *herpes simplex* de types 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2) qui nécessitent l'utilisation d'un milieu de transport spécifique. Les autres pathogènes (*H. ducreyi, C. trachomatis* de sérotype L1, L2 ou L3 et *K. granulomatis*) sont moins fréquents. Pour rechercher *H. ducreyi*, il faut prélever la base de l'ulcère en évitant le pus ou aspirer les bubons.

Transport, stockage

Le diagnostic des pathologies infectieuses bactériennes vaginales s'effectue avant tout à l'examen direct. Le prélèvement vaginal ne nécessite pas l'utilisation de milieu de transport s'il peut être transmis rapidement au laboratoire. S'il doit être conservé une douzaine d'heures au maximum au réfrigérateur, il faut éviter sa dessiccation et ne pas hésiter à mettre quelques gouttes d'eau salée à 0,9 % stérile dans le fond du tube si des écouvillons secs ont été utilisés. Les systèmes commerciaux comprenant écouvillon et milieu de conservation peuvent être conservés jusqu'à 48 heures à 4 °C. Si un frottis a été réalisé, il faut le transporter dans un porte-lame.

Les prélèvements réalisés au niveau du haut appareil génital, endocol compris, doivent permettre de mettre en évidence des bactéries fragiles, capnophiles et anaérobies. En conséquence, ces prélèvements doivent être transportés rapidement pour être ensemencés le plus rapidement possible. Sinon, il faut utiliser des milieux de transport et se confronter aux conditions de stockage préconisées par le fabricant (température ambiante ou 4 °C). Pour les *Chlamydiae*, il faut utiliser les milieux de transport fournis avec le kit de prélèvement.

Les prélèvements d'ulcérations génitales doivent être effectués au laboratoire pour être examinés extemporanément.

Éléments non bactériologiques du diagnostic : la cytologie

L'existence d'un « ectropion physiologique » du col chez beaucoup de femmes s'accompagne d'une réaction inflammatoire en réponse à l'acidité vaginale qui se traduit par la présence de polynucléaires dans la glaire cervicale sur l'exocol. Il est donc impératif, pour éviter des faux positifs quant à une cytologie inflammatoire, de moucher le col avant tout prélèvement vaginal dans la région du col et avant tout prélèvement endo-utérin par voie basse, endocol compris.

Examen cytologique du prélèvement vaginal

Cet examen s'effectue entre lame et lamelle et après coloration. Pour l'examen à l'état frais, on dépose sur une lame une goutte de sécrétions vaginales et on recouvre d'une lamelle. La préparation est observée à l'objectif sec. Les colorations de Gram et/ou de Giemsa aident à préciser la cytologie. Cet examen met en évidence les cellules vaginales et les polynucléaires. Il a une valeur primordiale. On peut compter le nombre de cellules épithéliales et de leucocytes par champ microscopique sur une dizaine de champs et en faire la moyenne. Le résultat transmis peut être succinct mais doit informer le clinicien par une conclusion nette sur l'aspect inflammatoire ou non du frottis. Un frottis inflammatoire est un frottis sur lequel les polynucléaires constituent l'essentiel de la préparation. Sinon, dès lors que les cellules vaginales des couches superficielles sont visibles, le frottis doit être considéré comme non inflammatoire quel que soit le nombre de polynucléaires. Ceux-ci peuvent être nombreux, par exemple au cours de la grossesse normale ou en deuxième partie de cycle.

Examen cytologique effectué sur les prélèvements utéro-annexiels, endocol inclus

Cet examen s'effectue après coloration d'un frottis du produit pathologique par la méthode de Gram ou en utilisant une coloration cytologique (May-Grünwald-Giemsa), ou après coloration par les deux méthodes. L'abondance des polynucléaires est très en faveur d'un processus infectieux. En revanche, l'absence de ces cellules ne permet pas d'exclure une infection.

Démarches du diagnostic direct sur le produit pathologique

La démarche générale utilisée en routine est synthétisée sur le tableau 23.4.

Tableau 23.4 **Examen direct et mise en culture des principaux prélèvements génitaux réalisés chez la femme.**

Type de prélèvement	Examen direct	Mise en culture
Vulve	Sans intérêt	– Sabouraud sélectif – Gélose Chapman – Gélose au sang
Paroi vaginale	– État frais : • cellules et polynucléaires : frottis inflammatoire ou non • *Trichomonas* • levures – Coloration de Gram : classification de Nugent • flore de Doderlein • levures • flore de vaginose • autres germes	– Utile si vaginite bactérienne à l'examen direct (frottis inflammatoire + disparition des lactobacilles + présence d'un seul morphotype bactérien) – Utile pour la recherche de BVHRI pendant la grossesse – Milieux, au moins : • gélose chocolat sous CO_2 • gélose Columbia sang de mouton en anaérobiose
Endocol et prélèvements endo-utérins	Coloration de Gram ± coloration cytologique : – Polynucléaires – Bactéries	– Au minimum : • gélose chocolat enrichie sans inhibiteurs • gélose triptycase soja au sang de cheval en aérobiose • gélose Columbia au sang de mouton en anaérobiose – Si suspicion d'IST : TAAN – Si infection utéro-annexielle : • TAAN • milieux mycoplasmes • culture en bouillon sur les biopsies
Urètre	Coloration de Gram ± coloration cytologique : – polynucléaires – gonocoques – bactéries d'autres morphotypes – levures	– Au minimum : • gélose chocolat enrichie avec et sans inhibiteurs • gélose TS au sang de cheval en aérobiose • gélose Columbia au sang de mouton en anaérobiose – Si suspicion d'IST : • TAAN • milieux mycoplasmes
Glandes de Bartholin	Coloration de Gram ± coloration cytologique : – polynucléaires – gonocoques – bactéries d'autres morphotypes	– Au minimum : • gélose chocolat enrichie sans inhibiteurs • gélose TS au sang de cheval en aérobiose • gélose Columbia au sang de mouton en anaérobiose

Prélèvement vulvaire

L'examen direct n'apporte que peu de renseignements. Néanmoins, dans les mycoses vulvaires, la présence de levures à l'examen direct signe le diagnostic.

En présence de lésions inflammatoires vulvaires, la mise en culture doit utiliser des milieux qui permettent d'identifier les cultures abondantes de levures (par exemple, milieu de Sabouraud sélectif), *S. aureus* (par exemple milieu gélosé de Chapman) et *S. pyogenes* (gélose au sang).

Il existe un cas particulier : chez la petite fille, un ensemencement sur gélose chocolat enrichie, incubée pendant 24 heures sous CO_2, permet l'isolement des gonocoques, d'autres *Neisseria*, et des bactéries capnophiles parfois responsables de vulvovaginites. Chez la femme, on préférera, pour ces recherches, des prélèvements vaginaux, endocervicaux, urétraux et urinaires.

Prélèvement vaginal

L'examen d'un prélèvement vaginal nécessite les renseignements cliniques suivants : grossesse ou non, IST suspectée ou non.

En effet, le prélèvement vaginal a trois objectifs :

- chez la femme symptomatique, rechercher une cause à une pathologie infectieuse vaginale. Dans ce cadre, l'examen bactériologique de routine doit porter le diagnostic de mycose, d'infection à *T. vaginalis*, de vaginose, et exceptionnellement de vaginite bactérienne chez la petite fille essentiellement. L'ensemble de ces pathologies se diagnostique par l'examen direct qui, par conséquent, doit être minutieux et prolongé ;
- chez la femme asymptomatique, rechercher une « bactérie vaginale à haut risque infectieux » (BVHRI). Cette recherche n'a fait la preuve de son utilité, actuellement, qu'au cours de la grossesse. En dehors de cette circonstance, l'asepsie chirurgicale paraît suffisante pour éviter les infections hautes chez les femmes porteuses asymptomatiques, à condition qu'elle soit réalisée correctement et que l'antiseptique soit appliqué en deux temps et puisse agir suffisamment longtemps avant l'acte invasif. La recherche de BVHRI chez la femme enceinte nécessite la mise en culture car ces bactéries sont rarement visibles à la coloration de Gram, quelle que soit la densité apparente de la culture (densité inférieure à 10^4 bactéries/g). Ces cultures doivent pouvoir mettre en évidence toutes les BVHRI si la femme enceinte est en situation à risque infectieux (rupture prématurée des membranes, menace d'accouchement prématuré) et spécifiquement *S. agalactiae*, s'il s'agit d'une recherche systématique à 34–38 semaines d'aménorrhée au cours d'une grossesse qui évolue normalement (recommandations nationales) ;
- chez la femme suspecte d'IST ou si l'on diagnostique une infection à *T. vaginalis*, le prélèvement vaginal peut faire l'objet d'une recherche de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium* par l'emploi de TAAN. Dans ce cas, il faut parallèlement examiner les urines du premier jet et éventuellement l'endocol.

Traitement de l'échantillon

L'échantillon doit être préparé pour pouvoir effectuer un examen direct et si nécessaire des cultures. Quelques gouttes d'eau salée à 0,9 % sont déposées dans le tube pour imbiber l'écouvillon s'il s'agit d'un écouvillon sec. Si l'on ne dispose pas de deux écouvillons secs, les cultures seront réalisées en premier, puis les lames pour l'état frais et l'examen après coloration de Gram seront préparées. Si l'écouvillon est inclus dans un tube contenant un milieu de conservation, le même milieu pourra être utilisé pour l'examen direct et pour les cultures.

Examen direct et interprétation des résultats

La démarche diagnostique est résumée sur la figure 23.3.

État frais

Sur une lame, une goutte de sécrétion vaginale est recouverte d'une lamelle. La préparation est observée à l'objectif sec, grossissement ×200 ou ×400 ; cet examen met en évidence les cellules vaginales et les polynucléaires, la mobilité de *T. vaginalis* et les levures. La mobilité du *Trichomonas* peut n'être visible qu'après avoir laissé réchauffer la préparation. Il faut garder à l'idée qu'un frottis inflammatoire est avant tout le résultat d'une infection à *Trichomonas* qu'il faudra rechercher avec attention.

Au cours de l'infection à *T. vaginalis*, le frottis est inflammatoire. Au cours des mycoses, le frottis est non inflammatoire dans la grande majorité des cas.

Coloration de Gram

L'idéal est d'effectuer la coloration de Gram sur un frottis réalisé par étalement des sécrétions vaginales au moment où l'on prélève. Sinon, on peut soit laisser sécher la lame qui a servi à l'examen à l'état frais après avoir enlevé la lamelle, soit pratiquer un étalement grossier assez dense sur une nouvelle lame avant de pratiquer une coloration de Gram.

Cet examen permet de préciser la cytologie, de confirmer la présence des levures et de juger de l'aspect de la flore bactérienne vaginale. La flore vaginale sera classifiée selon le score de Nugent-Krohn-Hillier [5] qui permet d'indiquer l'aspect normal de la flore vaginale ou de faire le diagnostic des fréquentes (7 à 8 % de femmes dans les études françaises) vaginoses bactériennes (Tableau 23.5).

- *Diagnostic des infections à T. vaginalis*. Au cours des infections à *T. vaginalis*, le frottis est quasi exclusivement composé de polynucléaires. La flore vaginale d'accompagnement est soit de type « vaginose bactérienne », soit monobactérienne. Dans ces deux cas, on n'identifiera pas les bactéries observées et on ne pratiquera pas d'antibiogramme, sauf si la flore d'accompagnement comprend une BVHRI chez une femme enceinte. Le traitement de l'infection à *T. vaginalis* s'accompagnera généralement d'un rééquilibrage de la flore vaginale vers un score de 0 à 3 de Nugent (Tableau 23.5).
- *Diagnostic des mycoses*. Au cours des mycoses, la cytologie vaginale est non inflammatoire et le diagnostic de mycose est affirmé par la présence de levures. Rappelons que le diagnostic de mycose se définit par un examen direct positif. L'isolement de levures à la culture avec un examen direct négatif, quelle que soit la densité apparente de la culture, définit le portage (15 à 20 % des femmes). Au cours des mycoses, la flore bactérienne vaginale est généralement de bonne qualité, de score 0 à 3 de

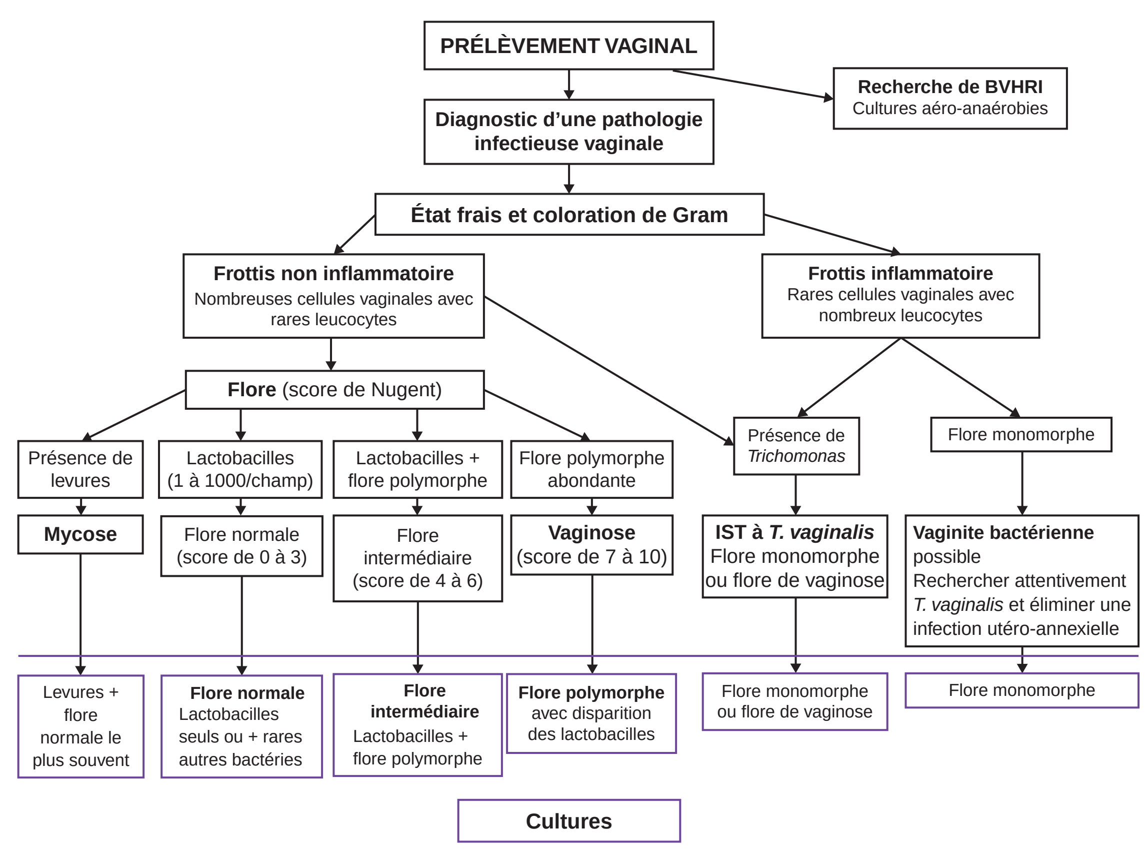


Fig. 23.3 Logigramme de prise en charge et d'interprétation du prélèvement vaginal. BVHRI : bactéries vaginales à haut risque infectieux ; IST : infection sexuellement transmissible.

Tableau 23.5 Classification de la flore vaginale à la coloration de Gram (objectif à immersion ×1000) selon le score de Nugent.

Score	Lactobacilles	Bacilles à Gram positif/négatif correspondant à la prolifération polybactérienne des bactéries rapportée au Tableau 23.2	Bacilles incurvés correspondant aux *Mobiluncus*
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ ou 2+
2	2+	2+	3+ ou 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

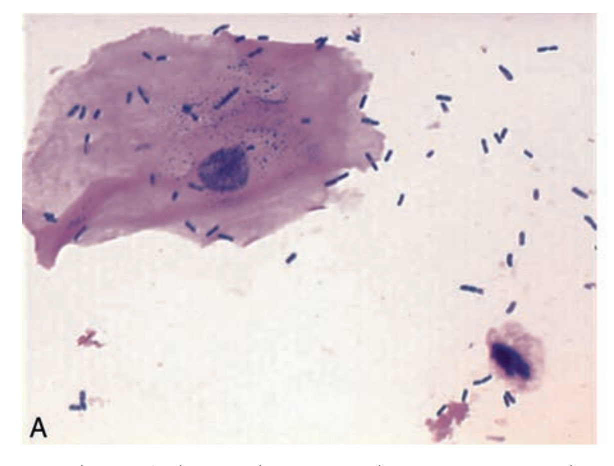
Les morphotypes bactériens (moyenne sur plusieurs champs microscopiques) sont codifiés de la façon suivante : 0, absence ; 1+, < 1 bactérie ; 2+, 1 à 4 bactéries ; 3+, 5 à 30 bactéries ; 4+, > 30 bactéries.
Les trois scores correspondant à chaque morphotype doivent être additionnés.
Interprétation : score de 0 à 3, flore normale ; score de 4 à 6, flore intermédiaire ; score de 7 à 10, flore de vaginose.

Nugent, c'est-à-dire composée quasi exclusivement de lactobacilles.

- Diagnostic des vaginoses bactériennes. Les bactéries des vaginoses bactériennes sont nombreuses (Tableau 23.2) [6]. Elles ne doivent être ni cultivées ni identifiées à partir des prélèvements vaginaux. En effet, le diagnostic de vaginose bactérienne s'effectue par la coloration de Gram en utilisant le score de Nugent (Tableau 23.5) et non par la culture bactérienne. Néanmoins, nous rappelons les principales caractéristiques de certaines bactéries impliquées, car nombre d'entre elles peuvent être isolées de prélèvements utéro-annexiels au cours des infections génitales hautes ou de chorioamniotites (Tableau 23.6). Ces infections surviennent en effet plus souvent chez les femmes atteintes de vaginose, en particulier sur stérilet ou dans le postpartum. La flore de vaginose correspond à un score de 7 à 10 de Nugent. Le diagnostic de vaginose est en réalité assez facile puisque la quantité de bactérie est 100 à 100 000 fois plus élevée que dans la flore normale. La prolifération bactérienne polymorphe est donc un critère majeur du diagnostic quelle que soit la nature des bactéries observées dans cette pathologie. À l'observation des lames, les tableaux de vaginose apparaissent d'une grande diversité (Fig. 23.4). Dans certains tableaux prédominent les bacilles à Gram négatif (*Gardnerella*, bacilles à Gram négatif anaérobies). Dans d'autres prédominent des *Mobiluncus* ou des bactéries à Gram positif (*Peptostreptococcus*, streptocoques *viridans*, *Atopobium*) et les mycoplasmes. On note fréquemment la présence de cellules cloutées (*clue cells*), cellules épithéliales vaginales massivement recouvertes de bactéries. Quoi qu'il en soit, le diagnostic repose sur la présence massive de bactéries polymorphes dans la cavité vaginale parfaitement identifiable par la coloration de Gram. De nouveaux moyens diagnostiques de la

Tableau 23.6 **Principales bactéries des vaginoses bactériennes.**

Gardnerella vaginalis	Gardner et Duke [4] ont décrit cette bactérie tout d'abord sous le nom d'*Haemophilus vaginalis*. Cette bactérie a été renommée *Corynebacterium vaginale* car elle n'exigeait ni facteur X, ni facteur V, était souvent groupée en palissade et difficilement décolorée à la coloration de Gram. La taxonomie moderne en a fait un genre spécifique qui ne comporte pour le moment qu'une seule espèce. Cette bactérie est un bacille anaérobie facultatif, non sporulé, non encapsulé, de Gram variable. Sa croissance est favorisée par le CO_2 à 35 °C. Elle est oxydase, catalase, indole, nitrate et uréase négatives. Elle hydrolyse l'hippurate, fermente l'amidon, le raffinose, le glucose, le maltose et le sucrose, mais pas le mélibiose ni le mannitol. Autour des colonies, on observe une β-hémolyse sur gélose au sang humain mais pas sur gélose au sang de mouton. Le rôle exact de *G. vaginalis* dans la physiopathologie de la vaginose bactérienne reste en partie inconnu. En effet, *G. vaginalis* est une bactérie commune de la flore vaginale endogène. La recherche de *G. vaginalis* pour le diagnostic de vaginose bactérienne a une valeur prédictive positive médiocre (50 %).
Bactéries anaérobies (voir chapitre 37)	En 1978, Pheifer et al. [7] évoquent un rôle probable des bactéries anaérobies dans la pathogénie des vaginoses bactériennes. Ultérieurement, de nombreuses études ont confirmé le rôle majeur des bactéries anaérobies strictes dans la physiopathologie de certaines vaginoses bactériennes. La plupart des espèces anaérobies à Gram négatif ont été mises en évidence dans la vaginose bactérienne, en particulier les espèces appartenant aux genres *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Veillonella*, parmi lesquelles les espèces les plus souvent rencontrées et quantitativement prédominantes sont *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens*, *Porphyromonas asaccharolytica* et *Fusobacterium nucleatum*. Les bactéries anaérobies à Gram positif et en particulier les *Peptostreptococcus* apparaissent comme des agents fréquemment isolés parallèlement aux *Prevotella* dans les vaginoses. Les études quantitatives ont permis de montrer qu'au cours de la vaginose bactérienne à anaérobies, les lactobacilles ne diminuaient pas toujours significativement mais qu'il s'agissait d'une diminution relative au regard de la forte augmentation du nombre d'anaérobies, en particulier de *Prevotella* et *Peptostreptococcus*. Au total, la pathologie paraît être en relation avec la prolifération bactérienne souvent largement supérieure à 10^9 bactéries/g de sécrétions vaginales plutôt qu'avec la présence d'un agent anaérobie spécifique. Les *Mobiluncus* spp. sont des bacilles incurvés, à Gram variable, mobiles, qui avaient été observés dans les sécrétions vaginales dès la fin du XIXe siècle. Le genre *Mobiluncus* comporte actuellement deux espèces, *Mobiluncus curtisii* et *Mobiluncus mulieris*. L'espèce *M. curtisii* comporte deux sous-espèces : *M. curtisii* subsp. *curtisii* et *M. curtisii subsp. holmesii*. Les bactéries du genre Mobiluncus sont des micro-organismes de croissance lente et difficile. On ne peut recommander la mise en évidence par culture des *Mobiluncus* comme moyen spécifique de diagnostic de la vaginose bactérienne. Le genre *Atopobium* comporte des bactéries à Gram positif, de forme coccoïde ou bacillaire, anaérobies strictes et produisant principalement de l'acide lactique lors de la fermentation des sucres. Il a été créé en 1992 par Collins et Wallbranks [2]. En 1999, une nouvelle espèce du genre *Atopobium*, isolée de la flore vaginale, a été nommée *Atopobium vaginae* par Rodriguez-Jovita et al. [8].
Streptocoques du groupe viridans	La présence de streptocoques viridans dans la flore vaginale naturelle est régulièrement évoquée. La taxonomie moderne a pu démontrer qu'il s'agissait en réalité parfois de bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* qui, à la coloration de Gram, apparaissent comme des diplocoques en courtes chaînettes donnant en culture des petites colonies α-hémolytiques sur gélose au sang. Néanmoins, *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus intermedius* et *Streptococcus morbillorum* sont communément retrouvés en grande quantité chez les femmes atteintes d'authentiques tableaux de vaginose bactérienne.
Mycoplasmes	Les mycoplasmes sont des bactéries dépourvues de paroi non colorables par la coloration de Gram. Trois espèces sont régulièrement identifiées dans la flore vaginale normale, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma genitalium* (voir chapitre 35).



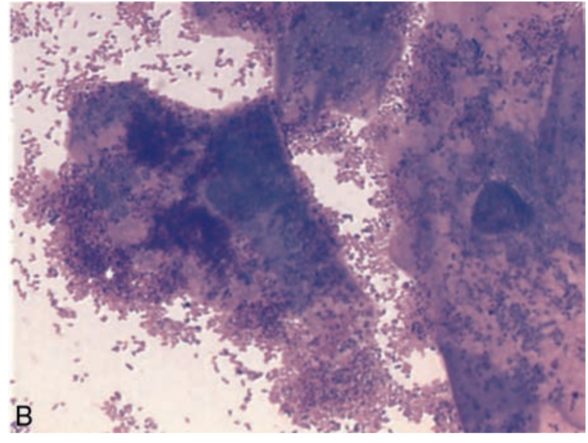


Fig. 23.4 A. Flore vaginale normale, score à 0 de Nugent **B.** Aspect de vaginose à l'examen direct au Gram présence de *clue-cells*. *(Photographies : Philippe Lanotte.)*

vaginose bactérienne sont à l'étude. Il s'agit par exemple de l'utilisation de la PCR quantitative ciblant *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* et *Prevotella* spp., mais le rapport coût/efficacité par rapport à la coloration de Gram mérite d'être évalué. D'autres méthodes cherchent à mettre en évidence les métabolites produits par l'abondante flore microbienne du milieu vaginal. Ainsi, un test à la potasse positif, un pH vaginal au dessus de 4,5 sont en faveur du diagnostic de vaginose, en plus des *clue-cells*.
- *Diagnostic de vaginite bactérienne*. Cette pathologie est quasi inexistante chez la femme en période d'activité ovarienne. Elle est le fait plus particulièrement de la petite fille chez laquelle, parfois, la pathologie révèle l'existence d'un corps étranger associé ; on la retrouve aussi chez la femme ménopausée de longue date. À l'examen à l'état frais et à la coloration de Gram, le frottis est inflammatoire. À l'examen après coloration de Gram, les leucocytes sont nombreux, les lactobacilles ne sont pas présents et la flore vaginale est constituée d'une flore monomorphe d'abondance variable (diplocoques à Gram positif ou bacilles à Gram négatif le plus souvent). Avant de conclure à une vaginite bactérienne, il faut éliminer avant tout la présence de *Trichomonas*, en particulier chez la femme en période d'activité génitale.

Mise en culture

Le diagnostic des pathologies vaginales relevant de l'examen direct, la mise en culture des sécrétions vaginales n'est utile que :
- lorsque l'examen direct révèle la rare vaginite bactérienne ;
- pour rechercher une BVHRI au cours de la grossesse ou, pour certains, avant un acte diagnostique ou thérapeutique par voie basse.

Une culture sur gélose Columbia + sang de mouton incubée pendant 48 heures en anaérobiose et une gélose au sang cuit incubée sous 5 à 8 % de CO_2 suffisent généralement pour isoler les bactéries de vaginites bactériennes. En outre, ces deux milieux permettent une croissance bactérienne qui reflète, au plus proche, les résultats de l'examen direct quant à l'aspect de la flore vaginale. D'autres milieux incubés en aérobie ou sous CO_2 peuvent être ajoutés en fonction des procédures d'identification de chacun.

Pour la recherche des BVHRI (*S. agalactiae* et autres streptocoques β-hémolytiques, *E. coli* et autres entérobactéries, *S. aureus*, *H. influenzae* et autres bacilles à Gram négatif capnophiles, *S. pneumoniae*, etc.), on peut utiliser les mêmes milieux que pour le diagnostic des vaginites bactériennes lorsque les parturientes sont en situation à risque infectieux. Pour le dépistage systématique de *S. agalactiae* à 34–38 semaines d'aménorrhée, les recommandations nationales préconisent l'utilisation de la gélose au sang ensemencée en quadrant. La réponse est semi-quantitative dans la mesure où la réponse doit indiquer le nombre de quadrants (1+ à 4+) dans lesquels on observe une culture bactérienne. Des milieux chromogènes, commercialisés pour aider à repérer des colonies de *S. aglactiae* (Granada® Biolys ; Strepto B ID®, bioMérieux ; Strepto B Agar®, AES), ou des milieux sélectifs pour Gram positif (gélose Columbia ANC [acide nalidixique et colistine] + 5 % de sang de mouton) peuvent être utilisés en complément.

On pourra ensemencer une gélose Sabouraud sélective lorsque des levures auront été observées à l'examen direct tout en sachant que les levures cultivent parfois mieux sur la gélose au sang cuit sous CO_2. Rappelons, comme indiqué ci-dessus, que le diagnostic de mycose s'effectue à l'examen direct et que la présence de *Trichomonas* rend inutile l'identification de toute flore d'accompagnement, même monobactérienne.

Il existe des cas particuliers. La recherche de gonocoques par culture ne doit pas être faite sur un prélèvement vaginal, sauf chez la petite fille ou lorsque l'on ne peut pas réaliser un prélèvement d'endocol (femme hystérectomisée). Dans ces cas, on utilise en plus une gélose chocolat enrichie additionnée du mélange VCN (vancomycine, colistine, nystatine) ou VCNT (vancomycine, colistine, nystatine, triméthoprime) ou VCAT (vancomycine, colistine, amphotéricine B, triméthoprime). En outre, comme pour la recherche de *Chlamydiae*, la recherche de gonocoque peut être réalisée sur les sécrétions vaginales dès lors que l'on utilise des TAAN comme moyen diagnostique. En effet, si le milieu vaginal est peu propice à la survie du gonocoque, les acides nucléiques éliminés par le col peuvent être détectés dans le vagin avec des performances satisfaisantes.

Prélèvements endocervicaux et endo-utérins

Ces prélèvements ont deux objectifs :
- rechercher l'étiologie d'une endocervicite dans un contexte d'IST, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium*. Dans ce cadre, le prélèvement est souvent associé à un prélèvement vaginal, urétral ou du premier jet d'urine ;
- rechercher l'étiologie d'une infection utéro-annexielle (endométrite, pyométrie, salpingite) ou d'une chorioamniotite. Ces infections étant le plus souvent acquises par voie ascendante, il faut pouvoir mettre en évidence, sur ces prélèvements, comme sur des pus, toutes les bactéries des groupes II et III indiquées sur le tableau 23.1.

Examen direct et interprétation des résultats

L'examen direct est effectué après mise en culture de l'échantillon par coloration de Gram. Il est souvent peu informatif. La présence de sang peut gêner l'examen.

Dans un premier temps, on évalue la qualité du prélèvement. La présence de cellules épithéliales vaginales superficielles et/ou de lactobacilles indique une contamination vaginale qui doit faire déclarer le prélèvement comme non conforme. L'abondance des leucocytes est évaluée (rares, nombreux, très nombreux) ou quantifiée par champ microscopique. La nature des bactéries observées est décrite et quantifiée par champ microscopique. Néanmoins, la sensibilité de la coloration de Gram sur les prélèvements endocervicaux et endo-utérins est faible (40 à 65 % par exemple pour le gonocoque).

Mise en culture

Compte tenu de l'étendue des bactéries que l'on doit être capable d'isoler (groupes II et III, Tableau 23.1), on utilisera au minimum :
- deux géloses chocolat enrichies, l'une sans et l'autre avec inhibiteurs VCN ou VCNT ou VCAT incubées sous CO_2 ;
- une gélose trypticase soja additionnée de 5 % de sang de cheval incubée en aérobiose ;
- une gélose type Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton, incubée en anaérobiose.

L'utilisation de milieux sélectifs est rarement nécessaire et ne doit pas être envisagée comme un moyen de suppléer la mauvaise qualité du prélèvement. On peut néanmoins adjoindre aux milieux sus-cités une gélose Columbia ANC.

S'il s'agit de biopsie ou de produit de curetage recueilli chirurgicalement, on peut adjoindre des cultures en bouillon (milieu de Schaedler, milieu BHI, ou milieu de Rosenow).

Les cultures sont examinées à la 24e et à la 48e heure puis à 5 jours si on suspecte une gonococcie ou au cours des infections utéro-annexielles.

L'interprétation au laboratoire des cultures positives est simple dans deux circonstances. La présence de *Neisseria* conduit à confirmer qu'il s'agit bien de *N. gonorrhoeae*, et la présence d'assez nombreuses colonies d'une seule espèce bactérienne fait poursuivre l'identification avec antibiogramme.

L'interprétation est plus difficile quand la culture est polymicrobienne. La présence de deux, voire trois espèces bactériennes bien différenciées n'est interprétable qu'en fonction des renseignements cliniques. S'il y a manifestement une infection utérine ou une chorioamniotite, il convient de poursuivre l'analyse par identifications et antibiogrammes. Dans les cas difficiles, si on dispose à la fois de prélèvements cervicaux et endo-utérins, on confrontera les résultats des cultures en donnant plus de poids aux résultats des prélèvements endo-utérins.

Dans le cadre des suspicions d'IST, il faut privilégier l'utilisation des TAAN pour la recherche de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium* sur les prélèvements endocervicaux, vaginaux, urinaires ou urétraux qui sont sensibles et spécifiques ; néanmoins, leurs performances peuvent être modifiées par le sang et le mucus. Pour la recherche de *N. gonorrhoeae*, la culture offre la possibilité de confirmer l'identification – ce qui est nécessaire dans les affaires d'agression – et d'étudier la sensibilité de la souche aux antibiotiques.

Prélèvements urétraux

Les prélèvements urétraux sont traités comme les prélèvements endocervicaux. La recherche de mycoplasmes est pratiquée par cultures en milieux solides et liquides. Ces milieux permettent l'isolement de *Mycoplasma hominis* et d'*Ureaplasma urealyticum*, mais pas de *M. genitalium* pour lequel on aura recours aux TAAN.

Autres prélèvements

Prélèvements tubopéritonéaux (haut appareil génital)

Ces échantillons doivent être traités comme des pus profonds avec quelques spécificités. Des cultures en bouillon incubées au moins une semaine sont réalisées. On utilisera au minimum :

- deux géloses chocolat enrichies, l'une sans et l'autre avec inhibiteurs VCN ou VCNT ou VCAT incubées sous CO_2 ;
- une gélose trypticase soja additionnée de 5 % de sang de cheval incubée en aérobiose ;
- une gélose de type Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton, incubée en anaérobiose ;
- un bouillon (milieu de Schaedler, milieu BHI ou milieu de Rosenow) ;
- des milieux pour rechercher les mycoplasmes génitaux, milieux solides (type gélose A7) et milieux liquides (mini-galeries type Mycoplasma Duo®).

Selon l'examen direct, on pourra adjoindre des cultures sur milieux sélectifs (milieux de Chapman, de Drigalski, gélose Columbia ANC).

La recherche de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium* par utilisation de TAAN doit être systématique dès lors qu'il existe une atteinte tubaire, des adhérences, une périhépatite ou un syndrome de Fitz-Hugh-Curtis.

Prélèvements au niveau des orifices des glandes de Bartholin

Ces prélèvements sont traités comme des pus ouverts. Les milieux utilisés doivent permettre la croissance des aéro-anaérobies, des bactéries exigeantes en facteurs X et V, et du gonocoque.

Ulcérations génitales

Recherche de *Treponema pallidum* dans l'ulcération syphilitique

Cette recherche s'effectue à partir des produits de grattage du chancre ou de la ponction ganglionnaire par l'examen direct au microscope à fond noir plus ou moins immunofluorescence directe. Mais il faut savoir qu'il existe des tréponèmes commensaux, non pathogènes, sur certaines lésions ulcératives non infectieuses de la vulve et du vagin (par exemple cancer vulvaire). En conséquence, le diagnostic doit être confirmé par les résultats d'une sérologie syphilitique.

Recherche d'*Haemophilus ducreyi*

C'est chez la femme qu'on observe le « chancre en miroir ». Les cultures sont actuellement la méthode privilégiée. Le diagnostic direct sur un frottis s'effectue après coloration au bleu de méthylène ou au Giemsa à partir d'un prélèvement effectué à la base du chancre ou du pus ganglionnaire. Deux milieux sont ensemencés à partir de l'écouvillon ou de l'aspirat de bubons. On utilise des milieux gélosés riches, type chocolat Polyvitex® additionné de 5 à 10 % de sérum de veau fœtal, et milieu Columbia enrichi de sang de lapin. L'incubation des milieux est réalisée en atmosphère enrichie en 5 à 10 % de CO_2, au moins 48 heures et jusqu'à 10 jours (dans ce cas, il est utile d'utiliser un milieu rendu sélectif par addition de 5 µg/ml de vancomycine). La température d'incubation doit être de 33 à 35 °C. Des méthodes de PCR sont en développement et performantes.

Recherche de *Chlamydia trachomatis* sérotypes L1, L2, L3 au cours du lymphogranulome vénérien (LGV)

Les lésions observées sont très diverses, avec une papule non douloureuse qui guérit spontanément au stade primaire et qui passe souvent inaperçue. À ce stade, seuls la culture ou les TAAN effectués à partir de l'écouvillonnage de la lésion primaire permettent le diagnostic d'infection à *C. trachomatis*. Puis, aux stades secondaire et tertiaire, apparaissent les signes généraux avec manifestations très variables (abcès divers avec parfois fistulisation, adénopathies, rectite hémorragique, colite ulcéreuse, éléphantiasis génital, voire destructions tissulaires plus ou moins importantes). Devant de tels tableaux, le diagnostic clinique est difficile. Pour cette raison, à ces stades, la sérologie est souvent le premier exa-

men prescrit qui alertera sur la possibilité du LGV. L'analyse par culture ou à l'aide de TAAN des produits d'aspiration des bubons, des prélèvements effectués sur les lésions diverses (vagin, vulve, rectum, etc.) permettra de confirmer le diagnostic d'infections à *C. trachomatis*. La détermination du sérotype en cause nécessite le recours à des laboratoires spécialisés qui pourront effectuer des tests de confirmation par séquençage et étude du polymorphisme de restriction (chapitre 36.1).

Recherche de *Klebsiella granulomatis* au cours de la donovanose (granulome inguinal)

Cette recherche s'effectue par coloration de May-Grünwald-Giemsa des corps de Donovan sur une préparation effectuée à partir d'une parcelle de tissu granulomateux ou d'une biopsie.

Conclusion

Les prélèvements génitaux chez la femme sont très divers. Deux d'entre eux sont fréquemment réalisés, le prélèvement vaginal et le prélèvement au niveau de l'endocol. L'impact diagnostique de leurs résultats est très différent. En effet, l'endocol est un prélèvement endo-utérin qui doit être analysé comme un pus. Néanmoins, trois recherches spécifiques, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* et *M. genitalium*, doivent pouvoir être mises en évidence dès lors que l'on suspecte une IST. Le prélèvement vaginal a comme objet de diagnostiquer les mycoses, *T. vaginalis* et les vaginoses bactériennes, et de rechercher les bactéries à risque maternofœtal et néonatal chez la femme enceinte.

Références

[1] Bautista CT, Wurapa E, Sateren WB, et al. Bacterial vaginosis : a synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. Mil Med Res 2016 ; 3 : 4.

[2] Collins MD, Wallbranks S. Comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of Lactobacillus minutus, Lactobacillus rimae and Streptococcus parvulus : proposal for the creation of a new genus Atopobium. FEMS Microbiol Lett 1992 ; 74(2–3) : 235–40.

[3] Donati L, Di Vico A, Nucci M, et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. Arch Gynecol Obstet 2010 ; 281(4) : 589–600.

[4] Gardner HL, Dukes CD. Haemophilus vaginalis vaginitis : a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. Am J Obstet Gynecol 1955 ; 69 : 962–76.

[5] Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. J Clin Microbiol 1991 ; 29 : 297–301.

[6] Onderdonk AB, Delaney ML, Fichorova RN. The human microbiome during bacterial vaginosis. Clin Microbiol Rev 2016 ; 29(2) : 223–38.

[7] Pheifer TA, Forsyth PS, Durfee MA, et al. Nonspecific vaginitis : role of Haemophilus vaginalis and treatment with metronidazole. N Engl J Med 1978 ; 298 : 1429–34.

[8] Rodriguez-Jovita M, Collins MD, Sjoden B, et al. Characterization of a novel Atopobium isolate from the human vagina : description of Atopobium vaginae sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1999 ; 49(4) : 1573–6.

Pour en savoir plus

ANAES. Prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce ; 2001. RPC http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/prevention_antenatale_du_risque_infectieux_bacterien_-_rec.pdf.

Barbeyrac B. Actualités sur l'infection à Chlamydia trachomatis. Presse Med 2013 ; 42(4 Pt 1) : 440–5.

Bohbot JM, Lepargneur JP. La vaginose en 2011 : encore beaucoup d'interrogations. Gynecol Obstet Fertil 2012 ; 40(1) : 31–6.

La Ruche G, Goulet V, Bouyssou A, et al. Épidémiologie actuelle des infections sexuellement transmissibles bactériennes en France. Presse Med 2013 ; 42(4 Pt 1) : 432–9.

Lausac J, Lecomte P, Marret H. In : Leucorrhées. Gynécologie pour le praticien. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson ; 2014. p. 285–300.

Quentin R, Lanotte P, Mereghetti L. Prélèvements génitaux chez la femme. In : Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E, Quentin R, editors. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. 2e éd. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson ; 2007. p. 237–54.

REMIC. Référentiel en microbiologie médicale. Société Française de Microbiologie ; 2015.

Chapitre 24

Infections maternofœtales

A. Tazi, C. Plainvert, C. Poyart

PLAN DU CHAPITRE

Introduction

L'infection maternofœtale (IMF) représente une cause importante de morbidité et de mortalité néonatales. Elle est fréquente, pouvant toucher 0,5 à 1 % des naissances. Les infections touchant le fœtus surviennent in utero, celles touchant le nouveau-né à la période entourant l'accouchement. Le développement de l'infection néonatale précoce (définie comme survenant dans les 72 premières heures de vie) est favorisé par l'immaturité immunitaire du nouveau-né et, de ce fait, elle est encore plus fréquente chez les prématurés. L'incidence de l'infection néonatale certaine, définie par l'association de signes cliniques et la présence de micro-organismes dans le sang et/ou le liquide céphalorachidien (LCR), est de 1 à 4 pour 1000 naissances vivantes. L'incidence de l'infection néonatale probable, définie par l'association de signes cliniques et/ou biologiques et la présence de micro-organismes dans un prélèvement périphérique, est estimée entre 3 et 8 cas pour 1000 naissances vivantes. La mortalité associée aux infections néonatales est d'environ 10 % et les taux de séquelles, surtout après méningites, ont été évalués de 10 à 30 %. La fréquence et la gravité potentielle de l'IMF rendent compte de l'intérêt d'un diagnostic et d'un traitement précoces.

Le diagnostic d'IMF est cliniquement difficile et se fondera sur des arguments anamnestiques, cliniques et biologiques. Parmi les moyens biologiques, l'analyse bactériologique des hémocultures et du LCR du nouveau-né est primordiale. L'analyse bactériologique des prélèvements de liquide gastrique et des prélèvements superficiels, bien que recommandée par l'Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé (Anaes) en 2002, est considérée par l'Association américaine de pédiatrie comme n'ayant aucune valeur diagnostique dans l'infection néonatale précoce et n'est plus recommandée aux États-Unis.

Rappel clinique

Le diagnostic d'infection néonatale est difficile. Le nouveau-né est suspect d'infection dès lors qu'il existe des éléments cliniques appelés par les experts « critères majeurs » et « critères mineurs » d'infection qui ne préjugent pas de l'attitude thérapeutique. Néanmoins, la présence d'un ou de plusieurs de ces critères conduit à prescrire un bilan biologique qui comporte, au minimum, un hémogramme, des marqueurs sériques de l'inflammation (protéine C réactive [CRP], procalcitonine), et un bilan bactériologique qui sera détaillé ici. En outre, ce bilan sera prescrit dès lors que le nouveau-né est symptomatique.

Les critères majeurs retenus, en 2002 par les experts de l'Anaes (devenue Haute autorité de santé [HAS]) sont :

- un tableau évocateur de chorioamniotite ;
- un jumeau atteint d'une infection maternofœtale ;
- la température maternelle avant ou en début de travail ≥ 38 °C ;
- la prématurité spontanée < 35 semaines d'aménorrhée (SA) ;
- une durée d'ouverture de la poche des eaux ≥ 18 heures ;
- la rupture prématurée des membranes (RPM) avant 37 SA ;

En dehors d'une antibioprophylaxie maternelle complète (pénicilline G en IV 5 M d'UI, puis au moins une seconde injection de 2,5 M d'UI 4 heures plus tard ; ou amoxicilline en IV 2 g, puis au moins une seconde injection de 1 g 4 heures plus tard ; ou au moins deux injections d'érythromycine ou de céphalosporine en cas d'allergie) :

  - un antécédent d'infection maternofœtale à *Streptococcus agalactiae* ;
  - un portage vaginal à *S. agalactiae* ;
  - une bactériurie à *S. agalactiae* pendant la grossesse.

Les critères mineurs retenus par les experts de l'Anaes sont :

- une durée d'ouverture de la poche des eaux > 12 heures mais ≤ 18 heures ;
- la prématurité spontanée < 37 SA et ≥ 35 SA ;
- des anomalies du rythme cardiaque fœtal ou une asphyxie fœtale non expliquée ;
- un liquide amniotique teinté ou méconial.

De plus, les examens bactériologiques sont prescrits chez tous les nouveau-nés symptomatiques. Les signes cliniques évocateurs d'infections retenus par les experts de l'Anaes sont :

Bactériologie médicale

- une fièvre (> 37,8 °C) ou une hypothermie (< 35 °C), ou, en cas de réglage automatique d'un incubateur, une modification de la température de régulation ;
- des signes hémodynamiques : teint gris, tachycardie, bradycardie, augmentation du temps de recoloration capillaire, hypotension artérielle ;
- des signes respiratoires : geignement, tachypnée, dyspnée, pauses respiratoires, détresse respiratoire ;
- des signes neurologiques : fontanelle tendue, somnolence, troubles du tonus, troubles de conscience, convulsions ;
- des signes cutanés : purpura, éruption ;
- et tous les nouveau-nés qui vont mal sans explication.

Pathogénie

L'IMF est l'aboutissement d'un processus infectieux qui débute par une infection maternelle ou par la présence dans la flore génitale maternelle d'une bactérie vaginale à haut risque infectieux.

Trois voies de contamination sont possibles :

- la voie systémique transplacentaire, secondaire à une bactériémie maternelle ;
- la voie ascendante, la plus fréquente, secondaire à une colonisation du liquide amniotique par un micro-organisme pathogène provenant de la flore vaginale, avec ou sans ouverture de la poche des eaux ;
- la contamination par ingestion, inhalation et/ou atteinte cutanéomuqueuse au cours du passage dans la filière génitale.

À chaque stade, des prélèvements spécifiques sont à réaliser (Tableau 24.1).

Tableau 24.1 **Prélèvements à réaliser chez la mère et l'enfant en fonction du diagnostic évoqué.**

Diagnostic	Prélèvements
Infection maternofœtale in utero par voie hématogène – Listériose – Pyélonéphrite gravidique	Prélèvements maternels – Hémocultures – Prélèvement vaginal – Prélèvement d'endocol – Urines
Chorioamniotite	Prélèvements maternels (idem précédemment) Placenta Prélèvements chez le nouveau-né – Liquide gastrique – Prélèvements superficiels
Sepsis néonatal	Prélèvement de liquide gastrique Prélèvements périphériques Hémocultures Liquide céphalorachidien en cas de suspicion de méningite
Infection maternelle du post-partum – Endométrite et infection pelvienne – Bactériémie – Décès maternel	Prélèvements maternels du post-partum – Hémoculture – Prélèvement vaginal et endocol – Urines

La cavité amniotique du nouveau-né peut être infectée au cours des infections maternelles par voie hématogène transplacentaire. Les deux infections bactériennes les plus répandues dans ce cadre sont la listériose et la pyélonéphrite gravidique. Plus rarement, les agents responsables d'infections sexuellement transmissibles, syphilis par exemple, peuvent être mis en cause. La seconde voie de colonisation intra-amniotique est la voie ascendante, plus particulièrement liée à l'existence d'une infection génitale (vaginoses, endocervicites) ou à la présence d'une bactérie vaginale à haut risque d'IMF dans la flore génitale. Les situations obstétricales à risque important d'infection par voie ascendante sont l'ouverture prématurée du col et la RPM. Lors des accouchements normaux à terme, le portage de *S. agalactiae* est à haut risque de colonisation. Enfin, la colonisation peut survenir au passage de la filière génitale. Les bactéries les plus souvent responsables d'IMF sont répertoriées dans le tableau 24.2.

L'ensemencement de la cavité amniotique par voie hématogène ou par voie ascendante va, en l'absence de prise en charge, rapidement évoluer vers la chorioamniotite. La flore bactérienne est souvent monomorphe et abondante au cours de la contamination massive de liquide amniotique à risque d'infection ou au cours des chorioamniotites récentes. À l'inverse, la flore bactérienne est souvent polymorphe et moins abondante lors des fréquentes colonisations physiologiques du liquide amniotique au cours des accouchements normaux. Les conséquences de la contamination bactérienne apparaissent soit pendant l'accouchement, soit dans les quelques jours qui suivent l'accouchement. Cette infection néonatale d'origine maternelle se traduit par une bactériémie, une méningite, ou éventuellement des infections plus localisées : infections pulmonaires, infections urinaires, conjonctivites. Des métastases septiques succédant aux bactériémies sont possibles mais plus rares.

Tableau 24.2 **Principales bactéries responsables d'infection maternofœtale.**

Infections par voie hématogène – *Listeria monocytogenes* (listériose) – *Escherichia coli*, *Proteus* spp. et autres entérobactéries responsables de pyélonéphrite gravidique – *Treponema pallidum* (syphilis)
Infections par voie ascendante et/ou par contamination au cours du passage dans la filière génitale – Bactéries des cervicites • *Neisseria gonorrhoeae* • *Chlamydia trachomatis* – Bactéries des vaginoses (voir chapitre 23) – Bactéries vaginales à haut risque infectieux • *Streptococcus agalactiae* • *Escherichia coli* et autres entérobactéries, en particulier chez les patientes ayant reçu de multiples antibiothérapies • Entérocoques • *Staphylococcus aureus* • Streptocoques du groupe *milleri* (*Streptococcus anginosus, Streptococcus constellatus, Streptococcus intermedius*) • *Streptococcus pyogenes* et autres streptocoques β-hémolytiques • *Haemophilus influenzae* et *parainfluenzae* • Pneumocoques

Diagnostic bactériologique direct

Les prélèvements à réaliser au cours des infections néonatales sont rapportés sur le tableau 24.1. Certains sont effectués chez la mère. Il y a nombre de difficultés pour interpréter certains prélèvements néonataux en raison de l'abondance de la flore bactérienne vaginale et fécale qui colonise naturellement le nouveau-né lors de la naissance. En outre, les pratiques varient assez notablement d'un centre à l'autre. L'impact thérapeutique des résultats des prélèvements de liquide gastrique et des prélèvements superficiels chez le nouveau-né colonisé asymptomatique est aussi très divers.

Prélèvement de liquide gastrique et prélèvements périphériques

Objectifs

Ces prélèvements établissent très approximativement le contenu bactérien du liquide amniotique à la naissance. Celui-ci comporte naturellement les bactéries acquises in utero pendant l'accouchement, puis au passage de la filière génitale, voire celles de la flore fécale maternelle sur le périnée. La littérature apporte peu d'éléments qui permettraient de standardiser les méthodes d'analyse de ces prélèvements et d'établir des critères bactériologiques d'interprétation différenciant clairement la colonisation normale et physiologique du nouveau-né d'une contamination à risque infectieux. Cela explique dans doute en partie la très grande variabilité des performances attribuées à ces prélèvements comme moyen de porter le diagnostic d'infection néonatale (VPP = 13 à 100 % ; VPN = 67 à 100 %). Nombre d'auteurs concluent, sans doute avec des arguments, que : 1) la qualité méthodologique des études utilisant ces tests est généralement pauvre ; 2) même dans les études rigoureuses, les performances de ces tests varient énormément ; 3) la valeur de ces tests est limitée pour diagnostiquer une infection. C'est dire qu'il faut être restrictif dans l'interprétation de ces examens bactériologiques et ne s'intéresser qu'aux bactéries manifestement à risque (*Listeria monocytogenes*, *S. agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, pneumocoques) ou aux contaminations monobactériennes massives dès qu'il s'agit de bactéries usuelles de la flore intestinale ou périnéale (entérobactéries, en particulier *Escherichia coli*, anaérobies, streptocoques α-hémolytiques, etc.). En outre, l'interprétation doit se faire en tenant compte du contexte clinique de prélèvement.

Indication du prélèvement

En France, les indications de ces prélèvements sont relativement larges. On prélève s'il existe un problème infectieux maternel, si l'accouchement a eu lieu dans un contexte à risque infectieux, ou si l'examen du nouveau-né laisse suspecter une infection néonatale (Tableau 24.3).

Tableau 24.3 **Indications de réalisation de prélèvements périnataux (d'après le REMIC).**

Anamnèse maternelle ante-partum	Anamnèse per-partum	Signes cliniques néonataux
Antécédents d'infection lors d'un accouchement antérieur	Tableau évocateur de chorioamniotite*	Tout nouveau-né ayant un changement de comportement sans raison apparente
	Jumeau atteint d'une infection maternofœtale (IMF)	Fièvre > 37,8 °C ou hypothermie < 35 °C
	Température maternelle avant ou en début de travail ≥ 38 °C	Signes hémodynamiques : teint gris, tachycardie, bradycardie, augmentation du temps de recoloration capillaire, hypotension artérielle
	Prématurité spontanée < 35 semaines d'aménorrhée (SA)	Signes respiratoires : geignements, tachypnée, dyspnée, pauses respiratoires, détresse respiratoire
	Rupture de la poche des eaux ≥ 18 heures	Signes neurologiques : fontanelle tendue, somnolence, troubles du tonus, troubles de conscience, convulsions
	Rupture prématurée des membranes < 37 SA	Signes cutanés : purpura, éruption
	En dehors d'une antibioprophylaxie maternelle complète : – antécédent d'IMF à *S. agalactiae* – portage vaginal de *S. agalactiae* – bactériurie à *S. agalactiae* durant la grossesse	
	Ouverture prolongée de la poche des eaux (≥ 12 et < 18 heures)	
	Prématurité spontanée (≥ 35 et < 37 SA)	
	Anomalies du rythme cardiaque fœtal ou asphyxie fœtale non expliquée	
	Liquide amniotique teinté ou méconial	

* Chorioamniotite : fièvre maternelle ≥ 38 °C, tachycardie fœtale > 160/min avec un syndrome inflammatoire maternel et/ou présence de bactéries dans le liquide amniotique.

Actuellement, le portage isolé de *S. agalactiae* ne constitue pas une indication à effectuer un bilan de façon systématique dès lors que l'antibioprophylaxie perpartum a été correcte (exposition du fœtus aux antibiotiques pendant au minimum 4 heures), que l'accouchement s'est déroulé normalement dans des circonstances obstétricales normales, et que l'examen du nouveau-né est normal. Ce bilan bactériologique est préconisé en France lorsque l'antibioprophylaxie n'a pas été correcte (≤ 4 heures ou < 2 doses). Dans d'autres recommandations, ce bilan n'est pas préconisé dans cette circonstance, mais il est alors recommandé de pratiquer plutôt une hémoculture.

Réalisation des prélèvements

Dans les travaux publiés, les conditions techniques de réalisation de ces prélèvements (matériel utilisé, moment par rapport à la naissance, conditions de transport) sont généralement décrites de façon très succincte. Ceux-ci doivent être faits le plus près possible de l'accouchement en salle de travail.

Prélèvement de liquide gastrique (liquide amniotique)

Le prélèvement est recueilli par sondage gastrique. Quelques millilitres de liquide sont aspirés et mis dans un récipient stérile. La conservation s'effectue à 4 °C.

Prélèvements périphériques

Ces prélèvements sont effectués par écouvillonnage des cavités naturelles du nouveau-né ou de la peau. Ils concernent des sites multiples (conduit auditif externe, narines, bouche, yeux, ombilic, anus). La réalisation de ces prélèvements et le nombre de sites à prélever font débat. Depuis 2002, les experts de l'Anaes ont recommandé d'effectuer un prélèvement du conduit auditif externe et un autre prélèvement superficiel au choix de l'opérateur. En réalité, le service rendu par ces prélèvements semble médiocre.

Mise en culture

Les milieux de culture utilisés sont très variables aussi bien en pratique dans les laboratoires que dans la littérature. En outre, les performances des divers milieux et atmosphères d'incubation utilisés n'ont pas fait l'objet d'évaluation particulière quant à l'impact sur le soin. Les milieux recommandés par les experts de l'Anaes sont au minimum : une gélose au sang incubée en aérobiose, une gélose chocolat Polyvitex® incubée sous 5 à 8 % de CO_2 et une gélose au sang de mouton base Columbia incubée en anaérobiose. On peut ensemencer des milieux sélectifs ou chromogènes en fonction des habitudes des uns et des autres.

L'ensemencement d'une gélose au sang incubée en aérobiose est presque toujours effectué. Compte tenu de la grande diversité des bactéries que l'on doit être capable de mettre en évidence, l'utilisation de ce seul milieu ne paraît pas totalement satisfaisante. L'ensemencement d'une gélose au sang cuit (gélose chocolat Polyvitex®) incubée sous 5 à 8 % de CO_2 s'est imposé pour la mise en évidence des bactéries capnophiles qui ne sont pas une cause exceptionnelle d'IMF et néonatale, en particulier *H. influenzae*. En outre, ce milieu et ce système d'incubation permettent la mise en évidence des bactéries déficientes (certains streptocoques, entérobactéries, etc.) et de *Neisseria gonorrhoeae* qui est parfois isolé de ce type de prélèvements au cours des gonococcies maternelles.

L'ensemencement d'une gélose au sang de mouton base Columbia incubée en anaérobiose est absolument indispensable si l'on ne veut pas passer à côté d'une contamination materno-placento-fœtale à anaérobies et des rares mais possibles infections néonatales à bactéries anaérobies. En outre, l'examen du liquide gastrique est un bon indicateur du contenu bactérien du liquide amniotique au moment de l'accouchement. Il peut aider ainsi à documenter l'étiologie d'une chorioamniotite à anaérobies à risque d'endométrite du postpartum.

Interprétation des résultats des prélèvements du liquide gastrique et des prélèvements périphériques

La pratique de l'amniocentèse a permis de démontrer qu'au cours de l'accouchement normal, il existait une colonisation physiologique de la cavité amniotique. Dès l'ouverture de l'œuf, le liquide amniotique est rapidement colonisé par la flore bactérienne génitofécale, et ce même en l'absence de signe d'infection amniotique. Les résultats des cultures des liquides amniotiques obtenus par amniocentèse chez des patientes « contrôle » en cours de travail ont montré que les cultures n'étaient négatives que dans 25 % des cas. Lorsque les cultures sont positives au cours de ces accouchements normaux, les quantités de bactéries ne sont supérieures à 10^5 UFC/ml que dans 4 % des cas. Elles comportent des anaérobies dans 25 % des cas et des bactéries à « haut risque infectieux » dans 23 % des cas. Le liquide gastrique reflète à la naissance le contenu de la cavité amniotique éventuellement « surcolonisé » au passage de la filière génitale et sur le périnée. Cette colonisation microbienne naturelle explique la très grande variabilité de la sensibilité, de la spécificité, de la VPP de l'examen direct après coloration de Gram du liquide amniotique rapportée dans la littérature. La VPN de la culture semble bonne mais c'est également le cas de tous les marqueurs d'infection néonatale étant donné leur faible incidence (environ 1/1000).

Interprétation des examens directs du liquide gastrique

L'examen direct du liquide gastrique après coloration de Gram nécessite l'examen d'au minimum 20 champs microscopiques. Il permet de recueillir deux informations :

- le nombre de polynucléaires par champ microscopique. Un nombre de polynucléaires moyens > 3/champ microscopique est observé chez environ 50 % des nouveau-nés atteints d'infection certaine ou probable. Inversement, l'absence de polynucléaires n'est observée que chez 10 % des nouveau-nés atteints d'infection néonatale ;
- le nombre de bactéries par champ microscopique. Un examen direct de liquide gastrique est considéré comme positif lorsque l'on observe un seul morphotype bactérien à la coloration de Gram. Il s'agit le plus souvent de cocci à Gram positif en diplocoques ou en chaînettes

(*S. agalactiae*) ou de bacilles à Gram négatif (*E. coli*), plus rarement de bacilles à Gram positif (*L. monocytogenes*). Les bactéries observées doivent être comptées par champ microscopique. En effet, le nombre de bactéries observées informe le pédiatre quant à la probabilité de l'infection néonatale associée (Tableau 24.4).

Interprétation des cultures du liquide gastrique et des prélèvements superficiels

Une culture négative du liquide gastrique et des prélèvements périphériques est indicative de l'absence d'infection bactérienne en l'absence de traitement anté- ou pernatal (bonne VPN).

L'interprétation des cultures positives tient compte de la nature des bactéries observées, de la pureté de la culture et parfois du nombre de colonies observées.

- La présence de bactéries vaginales commensales appartenant à la flore dominante (lactobacilles essentiellement) est fortement corrélée avec une absence d'IMF.
- La présence de *L. monocytogenes*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes* et autres streptocoques β-hémolytiques, *H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *N. gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis* doit toujours être prise en considération. La présence de ces bactéries majore significativement le risque relatif (RR) d'IMF chez le nouveau-né.
- La présence d'entérobactéries, de streptocoques β-hémolytiques, de bactéries de la flore buccale (*Eikenella*, *Kingella*, *Capnocytophaga*, etc.) majore moins notablement le risque relatif d'IMF. C'est essentiellement dû aux difficultés qu'a le bactériologiste à différencier une colonisation naturelle par ces bactéries maternelles lors de l'accouchement d'une colonisation à risque d'IMF par ces mêmes bactéries. En effet, aucun critère bactériologique n'a été validé et publié pour nous aider à faire cette différenciation. Néanmoins, le risque relatif d'infection paraît majoré lorsque ces bactéries (en particulier *E. coli*) sont retrouvées en culture pure sur le liquide gastrique ou sur plusieurs sites examinés (liquide gastrique + un ou deux prélèvements superficiels). La pureté de la culture se juge sur l'examen de l'ensemble des milieux ensemencés, mais particulièrement sur la gélose non sélective incubée en anaérobiose et sur la gélose chocolat incubée sous CO_2.
- La présence de bactéries anaérobies en culture polybactérienne est assez commune sur la gélose au sang incubée en anaérobiose. Elle reflète la colonisation naturelle par les bactéries de la flore fécale. En revanche, une culture d'une bactérie anaérobie paraît bien corrélée avec un risque majoré d'infection lorsque la culture est monobactérienne et que le nombre de colonies est important (> 100/boîte). En outre, un tel aspect peut être informatif pour étayer l'étiologie d'une chorioamniotite.

Le sens clinique à donner aux résultats de ces prélèvements est discuté mais :

- en présence de signes cliniques et biologiques d'infection néonatale, la bactérie isolée du liquide gastrique et des prélèvements superficiels est pratiquement toujours la même que celle isolée des prélèvements centraux lorsqu'ils sont positifs. Ainsi, lorsque les prélèvements centraux sont négatifs, les résultats de ces prélèvements sont fortement indicatifs ;
- devant une évolution clinique rapidement favorable chez un enfant suspect d'infection à la naissance et qui a un bilan biologique normal (CRP et procalcitonine en particulier), la négativité de ce bilan permet d'aider à exclure le diagnostic d'infection bactérienne et d'arrêter l'antibiothérapie éventuellement initiée à la naissance.

En revanche, en l'absence de signes cliniques et biologiques d'infection néonatale chez un nouveau-né prélevé parce qu'il est né dans une situation à risque infectieux (RPM, accouchement prématuré, liquide teinté isolé), l'impact décisionnel d'un résultat positif de ces prélèvements varie notablement d'une équipe à une autre. La conduite à tenir doit faire l'objet d'une procédure élaborée par les différents acteurs concernés (obstétriciens, pédiatres, microbiologistes) et être connue de tous.

Tableau 24.4 **Densité des bactéries à l'examen direct du liquide gastrique et risque infectieux bactérien néonatal.**

Nombre de bactéries/champ	Prévalence des infections néonatales certaines ou probables
1–10 bactéries/champ	Environ 10 %
11–50 bactéries/champ	Environ 15 %
50–100 bactéries/champ	Environ 30 %
> 100 bactéries/champ	Environ 70 %

Frottis placentaires et placentoculture

Ces examens ont été préconisés au cours des années 1970 pour permettre un diagnostic rapide de l'infection hématogène à *L. monocytogenes*. En effet, l'examen direct des frottis placentaires est très performant dans la listériose maternofœtale. Depuis cette date, cet examen est toujours préconisé pour aider au diagnostic de listériose néonatale précoce et d'infections in utero. Certains ont étendu les indications à l'examen du liquide gastrique, et par conséquent, couplent systématiquement examen du placenta et examen du liquide gastrique. En effet, la positivité de l'examen direct des frottis placentaires effectué chez un nouveau-né suspect d'infection ou prélevé dans un contexte à risque infectieux est fortement associée à une infection (RR = 4,7) quel que soit le germe en cause.

Les experts de l'Anaes ont recommandé d'effectuer les examens du placenta uniquement lors des accouchements de mères fébriles (température > 38 °C au repos et confirmée).

Réalisation des prélèvements

Les frottis placentaires sont réalisés en salle de travail. L'excès de sang est éliminé avec une compresse stérile aussi bien sur la face maternelle que sur la face fœtale du placenta. Avec le petit bord d'une lame, on racle la face amniotique du placenta de l'insertion du cordon vers les membranes et on étale le produit de raclage grossièrement et en couche épaisse sur une seconde lame. On pratique de la même façon sur la face maternelle. Les deux étalements sont séchés à l'air libre et déposés dans un porte-lame. Les lames sont examinées au

microscope en même temps que le frottis de liquide gastrique après fixation dans le liquide fixateur hémolytique de Carnoy qui permet d'obtenir des lames faciles à lire.

Pour la culture de placenta, une biopsie d'environ 1 cm^2 de surface portant sur toute l'épaisseur du placenta, en plein centre des lésions si des abcès sont visibles (listériose par exemple) ou près de l'insertion du cordon si le placenta est apparemment normal, est réalisée. Le morceau de placenta recueilli est déposé dans un flacon stérile et conservé si nécessaire à 4 °C.

Mise en culture

Les milieux à ensemencer sont identiques à ceux utilisés pour le liquide gastrique : au minimum une gélose au sang de cheval incubée en aérobiose, une gélose au sang cuit + Polyvitex® incubée sous 5 à 8 % de CO_2, et une gélose au sang de mouton base Columbia incubée en anaérobiose.

Interprétation

Les examens directs et les cultures de placenta sont interprétés parallèlement et de la même façon que ceux du liquide gastrique. La cohérence des résultats des examens effectués sur le placenta et sur le liquide gastrique aide à différencier colonisation physiologique et contamination à risque infectieux, en particulier quand la culture met en évidence des entérobactéries, des streptocoques non β-hémolytiques, des anaérobies, et plus généralement des bactéries de la flore vaginale et intestinale. En effet, au cours des contaminations à risque infectieux, on observe une culture monobactérienne d'une même espèce sur les deux types de prélèvements, tandis que la colonisation naturelle du nouveau-né se traduit par un aspect polymorphe des cultures, surtout en anaérobie.

Hémocultures

Le diagnostic d'infection in utero repose en premier lieu sur la mise en évidence de la bactérie dans les prélèvements d'hémoculture (se référer au chapitre 13.1) réalisés chez la mère pendant la grossesse. Ils viseront essentiellement à mettre en évidence *L. monocytogenes*, des bactéries responsables de pyélonéphrite ou d'autres bactéries potentiellement en cause. L'analyse du placenta sera particulièrement importante dans ce contexte (voir plus haut).

En outre, les hémocultures sont réalisées chez tous les nouveau-nés suspects d'infection dès lors que le diagnostic de bactériémie est évoqué. En effet, ce moyen diagnostique reste la méthode de référence pour documenter la diffusion hématogène des bactéries à risque infectieux d'origine maternelle. Leurs performances sont très dépendantes de la qualité du prélèvement, en particulier lors de la ponction. Celles-ci sont réalisées si possible avant tout traitement antibiotique. Les hémocultures chez les nouveau-nés ont quelques spécificités en raison de la faible quantité de sang que l'on peut prélever.

Mode de prélèvement

Les hémocultures peuvent être effectuées à partir du cathéter ombilical pendant les deux ou trois premiers jours. Sinon, la ponction est faite sur une veine périphérique après une désinfection avec un antiseptique conformément aux procédures élaborées dans chaque centre. La désinfection cutanée est parfois difficile chez les nouveau-nés fortement colonisés en périphérie.

Volume optimal à prélever

L'impact important du volume de sang ensemencé sur les performances des hémocultures a surtout été montré chez l'adulte. Chez le nouveau-né, une hémodynamique et des moyens de défense différents n'autorisent pas à extrapoler les résultats obtenus chez l'adulte.

En pratique, les enquêtes montrent que la quantité de sang inoculée dans les flacons des centres de néonatologie est en moyenne de 0,6 à 0,7 ml et qu'un tiers des flacons contient moins de 0,5 ml de sang. Les difficultés pour prélever sont bien évidemment d'autant plus importantes que le nouveau-né est plus prématuré.

Depuis 2002, il est préconisé de prélever au moins un volume de 1 ml de sang, voire 2 ml si le poids du nouveau-né le permet. Au-dessous de 0,5 ml, l'examen peut être considéré comme non conforme mais ne pourra pas être rejeté par le laboratoire et devra être exécuté.

Nombre de flacons

Depuis les années 1970, chez le nouveau-né, il est admis que la réalisation d'une seule hémoculture est suffisante. Le rationnel de cette attitude est : 1) qu'il faut débuter le plus rapidement possible l'antibiothérapie – multiplier les ponctions impliquerait de retarder le début du traitement – ; 2) qu'il faut éviter les ponctions veineuses répétées au risque de devoir transfuser le nouveau-né ; et 3) que la bactériémie est plus permanente chez le nouveau-né que chez l'enfant plus âgé ou l'adulte, et donc qu'il n'y a pas lieu de multiplier les prélèvements pour augmenter les chances de positivité.

Durée d'incubation et interprétation

Il a été démontré que, chez le nouveau-né infecté, la probabilité pour qu'une hémoculture négative à 36 heures le soit toujours à 72 heures est de 99,8 %. En conséquence, la durée d'incubation de 5 jours généralement utilisée dans les laboratoires est suffisante. En outre, la VPN des hémocultures est telle qu'un délai de 48 à 72 heures est raisonnable pour réévaluer l'attitude thérapeutique chez les nouveau-nés en fonction de l'évolution clinique et du résultat des autres tests de laboratoire.

Lorsque les hémocultures sont positives à *E. coli* ou à *S. agalactiae*, il est recommandé de sérotyper les souches pour identifier *E. coli* de sérotype K1 ou *S. agalactiae* de sérotype III. Si les capacités techniques du laboratoire le permettent, le typage par PCR ou en spectrométrie de masse de *S. agalactiae* pour rechercher les souches de ST17 ou CC17, et d'*E. coli* pour rechercher les souches du groupe ECOR B2 peut être réalisé. L'identification de ces sérotypes et/ou complexes clonaux à très haut risque permet d'apporter un élément biologique supplémentaire pour évaluer le risque de méningite associé au sepsis de l'enfant. En effet, ces souches particulières sont la cause d'au moins 80 % des méningites néonatales.

Examen cytobactériologique du liquide céphalorachidien

Cet examen permet de confirmer le diagnostic de méningite néonatale, pathologie actuellement moins fréquente – incidence dans les premières 72 heures de vie : environ 0,25 cas pour 1000 naissances vivantes.

Indications de la ponction lombaire

Les rares études qui évaluent les pratiques des néonatologistes au regard des circonstances qui les conduisent à réaliser une ponction lombaire indiquent une assez grande variabilité des comportements, mais tous ont le souci de limiter cet examen. La ponction lombaire à la naissance est traumatique dans un quart des cas et la quantité de LCR recueillie est inadéquate dans un quart des cas. Au total, 28 à 37 % des ponctions lombaires effectuées chez les nouveau-nés sont inutilisables pour exécuter un examen bactériologique correct.

Les indications de la ponction lombaire les moins discutées chez les nouveau-nés sont : 1) les nouveau-nés suspects d'infection ayant des hémocultures positives, surtout lorsqu'il s'agit d'*E. coli* K1 ou de *S. agalactiae* de sérotype III (au moins 80 % des méningites néonatales) ; 2) les nouveau-nés suspects d'infection ayant des troubles neurologiques ; 3) les nouveau-nés ayant une altération de l'état général non ou mal expliquée.

Paramètres caractérisant le LCR normal chez le nouveau-né

Le LCR normal du nouveau-né comprend 0 à 50 globules blancs/mm^3. Le pourcentage de polynucléaires est très variable, mais les travaux les plus récents qui ont exclu toute infection par PCR montrent que 88 % des nouveau-nés n'ont pas de polynucléaires neutrophiles dans le LCR. La glycorachie se situe en moyenne à 2,77 mmol/l (1,89 mmol/l à 6,60 mmol/l) et la protéinorachie à 0,64 g/l (0,15 à 1,7 g/l). Comme chez l'adulte, il faut comparer la glycorachie à la glycémie. Le rapport glucose LCR/sang normal est d'environ 0,5. Néanmoins, des controverses existent sur l'interprétation des résultats.

Lors des méningites, comme chez l'adulte, le nombre de leucocytes/mm^3 et la protéinorachie s'élèvent, tandis que la glycorachie et le rapport glucose LCR/sang diminuent.

Mise en culture

Les cultures du LCR du nouveau-né s'effectuent comme pour tous les LCR (voir chapitre 14). Néanmoins, la quantité de liquide recueillie est régulièrement assez faible. Dans ce cas, une culture sur gélose au sang cuit Polyvitex® incubée sous 5 à 8 % de CO_2 et une culture en bouillon sont à privilégier.

Recherches spécifiques

Lorsque le nouveau-né a été exposé in utero aux antibiotiques (prophylaxie de l'infection précoce à *S. agalactiae*, dans la RPM et la chorioamniotite) ou traité avant la ponction lombaire sur des critères cliniques et biologiques, il faut rechercher les antigènes solubles et/ou les acides nucléiques de *S. agalactiae* et d'*E. coli* dans le LCR (voir chapitres 3.1 et 14). Des PCR universelles des ADN bactériens à l'aide d'amorces ciblant l'ARNr 16S, avec ensuite séquençage et identification des séquences par comparaison aux données des banques peuvent également être justifiés. Seule la mise à disposition de techniques validées autorise l'utilisation de ces méthodes moléculaires de diagnostic.

Examen des urines pour le diagnostic d'infection néonatale

Chez le nouveau-né de moins de 72 heures de vie, l'examen cytobactériologique des urines pour le diagnostic d'IMF n'est pas recommandé, de même que la recherche d'antigènes solubles de *S. agalactiae* et d'*E. coli.*

Examen cytobactériologique des urines

L'incidence de l'infection du tractus urinaire chez le nouveau-né varie de 0,1 à 1 % et peut atteindre 10 % chez les enfants de très petit poids. En réalité, ces chiffres incluent infections d'origine maternelle et infections nosocomiales. Chez le nouveau-né de moins de 3 jours, l'infection du tractus urinaire est en fait une éventualité rare. Plus probablement, les bactéries isolées dans l'urine chez le nouveau-né de moins de 72 heures sont reliées à la colonisation de surface ou sont le témoin d'une bactériémie.

Au total, en raison du faible service rendu par l'ECBU, il est recommandé de ne pas chercher à obtenir systématiquement une urine chez les nouveau-nés. En outre, il ne faut pas différer le traitement d'un nouveau-né pour attendre une émission d'urine.

Recherche d'antigènes urinaires

S'ils sont réalisés, les tests de détection d'antigènes urinaires doivent l'être sur des urines concentrées 20 à 25 fois pour améliorer leurs performances. Lorsqu'un nouveau-né a pu être correctement exploré à la naissance (liquide gastrique et prélèvements périphériques + frottis placentaires et placentoculture si fièvre maternelle + hémocultures) en l'absence d'antibiothérapie préalable, la recherche d'antigènes urinaires n'apporte pas de service supplémentaire au patient. Inversement, ces tests peuvent aider à faire un diagnostic rétrospectif chez les nouveau-nés préalablement traités pas antibiotiques ou lorsque l'exploration initiale n'a été que partielle. Malheureusement, il n'y a pas de tests qui couvrent l'ensemble des étiologies des infections néonatales d'origine maternelle.

Prélèvements respiratoires

Outre la recherche des pathogènes habituellement responsables d'infection néonatale précoce, la recherche de mycoplasmes (*Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum*) est recommandée chez les nouveau-nés prématurés. En effet, leur implication dans les dysplasies bronchopulmonaires est fortement suspectée. Les mycoplasmes génitaux devront être recherchés sur milieux spécifiques liquides et solides (voir chapitre correspondant). Cependant, l'interprétation des cultures positives est difficile, dans la mesure où ces bactéries sont fréquemment isolées dans la flore vaginale.

Pour en savoir plus

ANAES. Diagnostic et traitement curatif de l'infection bactérienne précoce du nouveau-né. Recommandations pour la pratique clinique ; 2002, http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/recos-_inn-_mel_2006.pdf.

Brady MT, Polin RA. Prevention and management of infants with suspected or proven neonatal sepsis. Pediatrics 2013 ; 132(1) : 166–8.

Denis F. Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant. John Libbey Eurotext ed ; 2002.

Lanotte P, Raymond J, Vauloup-Fellous C. Infections materno-fœtales et périnatales. In : REMIC. Référentiel en microbiologie médicale. Société française de microbiologie ; 2015. p. 301–11.

Polin RA. Committee on Fetus and Newborn. Management of neonates with suspected or proven early-onset bacterial sepsis. Pediatrics 2012 ; 129(5) : 1006–15.

Quentin R. Prélèvements chez le nouveau-né. In : Denis F, Ploy MC, Martin C, et al., editors. Bactériologie Médicale. Techniques usuelles. 2e éd. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson ; 2011. p. 255–67.

Wilson CB, Nizet V, Maldonado Y, et al. Remington and Klein's infectious diseases of the fetus and newborn infant. 8th ed. Philadelphie : W.B. Saunders Company ; 2016.

Chapitre 25

Prélèvements bactériologiques et assistance médicale à la procréation

L. Mereghetti, P. Lanotte, R. Quentin

PLAN DU CHAPITRE

Introduction

L'infertilité se définit par l'impossibilité de concevoir un enfant après un an de tentatives infructueuses. Elle concerne environ 10 à 15 % des couples dans les pays industrialisés. Elle est liée à une cause féminine dans environ 33 % des cas, à une cause masculine dans environ 20 % des cas, et à une étiologie mixte impliquant à la fois la femme et l'homme dans 32 % des cas ; dans 15 % des cas, aucune étiologie n'est retrouvée. Les étiologies de l'infertilité sont très nombreuses et parfois multiples, principalement liées à des pathologies tubaires, à des problèmes d'ovulation et à l'endométriose chez la femme, alors que les causes masculines sont essentiellement des oligospermies ou des azoospermies ; certaines de ces étiologies sont d'origine bactérienne.

Certaines causes d'infertilité peuvent être prises en charge dans le cadre de l'assistance médicale à la procréation, qui est l'ensemble des procédés par lesquels la fusion du spermatozoïde et de l'ovule est réalisée en dehors des relations sexuelles. Plusieurs techniques existent : insémination artificielle avec sperme du conjoint, fécondation in vitro intraconjugale ou avec sperme du donneur, fécondation assistée type micro-injection intracytoplasmique, etc.

Dans le contexte de l'assistance médicale à la procréation, la réalisation des prélèvements bactériologiques peut s'envisager avec deux objectifs distincts.

- Le premier objectif est d'identifier une éventuelle cause infectieuse à l'infertilité. Ces infections sont surtout dues à *Chlamydia trachomatis*, plus rarement à *Neisseria gonorrhoeae* ou à des pathogènes ordinaires, éventuellement anaérobies, et encore plus exceptionnellement à *Mycobacterium tuberculosis*.
- Le deuxième objectif est d'identifier une colonisation bactérienne, soit d'un échantillon (par exemple sperme), soit d'une localisation anatomique (par exemple endocol), qui aurait un impact sur la réalisation de la fécondation in vitro ou l'implantation de l'œuf. Dans ce même contexte, la contamination du milieu de culture (par exemple milieu de conservation des ovocytes) peut également être envisagée.

Cependant, il faut noter que, sur un plan strictement réglementaire, seuls l'examen bactériologique du sperme et les sérologies sont obligatoires dans le cadre de l'assistance médicale à la procréation.

Diagnostic bactériologique direct chez l'homme

Prélèvements

Le prélèvement du sperme est réalisé au laboratoire. Le recueil doit se faire après une abstinence de 2 à 5 jours, immédiatement après vidange vésicale. Après décalottage du gland, on réalise une toilette soigneuse du méat et du gland au savon antiseptique, ainsi qu'un lavage des mains avec le même produit. On applique ensuite une solution antiseptique sur le méat et le gland, puis on rince au sérum physiologique pour éliminer toutes traces d'antiseptiques. Après masturbation, l'éjaculat est recueilli dans un flacon stérile.

Certains centres réalisent également un examen cytobactériologique des urines à titre systématique (voir le chapitre 16).

En cas de symptomatologie urétrale, il faut réaliser également un prélèvement urétral (voir le chapitre 22, « Infections génitales chez l'homme »).

Démarche du diagnostic direct sur le produit pathologique

Examen direct

L'examen direct à l'état frais, ou par colorations de Gram ou de May-Grünwald-Giemsa, est peu contributif. De même, la numération leucocytaire après dilution du sperme donne des résultats peu satisfaisants et non reproductibles.

Cultures

Milieux de culture

Pour la recherche de bactéries communes, on ensemence 10 ou 100 µl de sperme dilué au 1/10e sur une gélose au sang (base Columbia ou trypticase-soja, enrichie de 5 % de sang de cheval ou de mouton) et une gélose type chocolat Polyvitex®. Certains laboratoires utilisent également une gélose au sang incubée en atmosphère anaérobie. Les géloses doivent être incubées 48 heures au minimum.

Pour les mycoplasmes génitaux, on ensemence 100 µl de sperme non dilué sur milieux enrichis en sérum et extrait de levures. Il existe des milieux solides (type gélose A7) et des milieux liquides (minigalerie type Mycofast® RevolutioN) qui permettent à la fois l'identification, la numération et l'antibiogramme du mycoplasme. Les géloses sont incubées 48 à 72 heures et les minigaleries 24 à 48 heures. Il est à noter que ces milieux permettent la croissance d'*Ureaplasma* spp. et de *Mycoplasma hominis*, mais pas de *Mycoplasma genitalium*.

Pour la recherche de *Chlamydia trachomatis*, la culture sur milieux gélosés usuels est impossible.

Identification

L'identification des bactéries « communes » se fait par les techniques usuelles, type galeries Api® (bioMérieux), cartes Vitek® (bioMérieux), plaques Microscan® (Siemens) ou Phoenix® (Becton-Dickinson), ou par spectrométrie de masse type MALDI-TOF.

Sur milieux gélosés, la morphologie des mycoplasmes génitaux observée au microscope (objectif 40) est caractéristique : colonies avec partie centrale plus dense et périphérie plus claire (image en « œuf au plat ») évocatrice de *Mycoplasma hominis* ; colonies denses de façon homogène (image en « oursin ») évocatrice d'*Ureaplasma* spp. L'identification des mycoplasmes génitaux par minigaleries repose sur leur résistance naturelle vis-à-vis de certains antibiotiques. Ces minigaleries permettent également de numérer *Ureaplasma* spp. (10^3, 10^4 ou $\geq 10^5$ unités de changement de couleur par millilitre [UCC/ml]) et *Mycoplasma hominis* ($\geq 10^4$ UCC/ml). S'il y a discordance entre les résultats observés sur minigaleries et sur milieux gélosés, par exemple minigalerie positive et gélose négative, repiquer les cupules positives de la minigalerie sur milieux gélosés afin de vérifier la morphologie des colonies (chapitre 35).

Résultats et interprétation

Environ 50 à 75 % des spermocultures sont négatives, 20 à 50 % sont polybactériennes, et 1 à 5 % sont monobactériennes. Il n'existe pas de règles d'interprétation clairement reconnues en fonction du type de bactéries et de leur quantité, et les critères d'interprétation varient suivant les laboratoires.

Compte tenu de la présence de la flore commensale présente au niveau du tiers externe de l'urètre, un seuil de 10^2 à 10^4 UFC/ml est retenu pour les bactéries « communes ». Le seuil est plus bas pour les entérobactéries et *Pseudomonas* ($\geq 10^2$ à 10^3 UFC/ml) que pour les staphylocoques, streptocoques et corynébactéries ($\geq 5{,}10^3$ à 10^4 UFC/ml) ou autres bactéries à Gram positif ($\geq 10^4$ UFC/ml). L'identification et l'antibiogramme sont réalisés en cas de culture monobactérienne ou en cas de nette prédominance d'une espèce.

En revanche, *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma* spp. sont des commensaux des voies génitales, ce qui rend plus difficile l'appréciation de leur pathogénicité. L'aspect quantitatif est donc important à prendre en considération ($\geq 10^4$ UFC/ml).

La présence de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* ou *Mycoplasma genitalium* signe l'infection, qu'elle soit symptomatique ou non.

Antibiotiques à tester

- La détermination de la sensibilité des bactéries « communes » se fait selon les recommandations CA-SFM/EUCAST.
- La détermination de la sensibilité des mycoplasmes peut se faire par antibiogramme en milieu liquide en utilisant les galeries d'identification.

Biologie moléculaire

- *Chlamydia trachomatis* : différentes techniques d'amplification génique sont actuellement commercialisées et ont supplanté les techniques « maison ». Elles sont souvent couplées à la recherche de *Neisseria gonorrhoeae*, plus rarement à celle de *Mycoplasma genitalium*. Elles sont très sensibles et très spécifiques, mais relativement onéreuses. Le contrôle après traitement ne doit pas être réalisé avant 6 semaines après l'arrêt de l'antibiotique.
- *Neisseria gonorrhoeae* : la mise en évidence de *Neisseria gonorrhoeae* peut également être réalisée par PCR. Différentes techniques d'amplification génique sont actuellement commercialisées et ont supplanté les techniques « maison ». Elles sont souvent couplées à la recherche de *Neisseria gonorrhoeae*, plus rarement à celle de *Mycoplasma genitalium*.
- *Mycoplasma genitalium* : différentes techniques d'amplification génique sont disponibles, soit en version techniques « maison », soit commercialisées ; parmi celles-ci, certaines permettent également la détection de *Chlamydia trachomatis* et de *Neisseria gonorrhoeae*.

Diagnostic bactériologique direct chez la femme

Prélèvements

- Les prélèvements réalisés chez la femme n'ont rien de spécifique : un prélèvement d'endocol et un prélèvement vaginal.
- La recherche de *Chlamydia trachomatis* peut également être réalisé par PCR sur un échantillon de premier jet d'urines.
- Certains centres réalisent aussi un ECBU à titre systématique.

Démarche du diagnostic direct sur le produit pathologique

La conduite pratique de l'examen bactériologique de ces prélèvements est réalisée selon la méthodologie décrite dans le chapitre 23, « Infections génitales chez la femme ».

Diagnostic bactériologique indirect

Le contexte réglementaire relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation est défini par les arrêtés du 11 avril 2008, du 3 août 2010 et du 2 juin 2014. On distingue trois situations.

Assistance médicale à la procréation intraconjugale et autoconservation de gamètes ou de tissus germinaux

Les sérologies pour les virus de l'immunodéficience humaine (VIH1/VIH2), de l'hépatite B (VHB), de l'hépatite C (VHC) et pour la syphilis sont effectuées chez les deux membres du couple dans les 3 mois précédant la tentative d'assistance médicale à la procréation s'il s'agit d'une première détermination, et ultérieurement chaque fois que le délai entre la tentative et la dernière détermination est supérieur à 12 mois.

Des examens supplémentaires sont éventuellement réalisés :

- recherche d'anticorps anti-HTLV1 pour les personnes vivant dans des régions à forte prévalence ou originaires de ces régions, ou dont les partenaires sexuels ou les parents sont originaires de ces régions ;
- recherches spécifiques en fonction d'une exposition particulière des personnes.

Assistance médicale à la procréation avec don de gamètes

- En vue d'un don de gamètes, les sérologies pour les virus VIH1, VIH2, HTLV1, HTLV2, VHB, VHC, cytomégalovirus (CMV) et pour la syphilis sont réalisées chez le donneur ou la donneuse. Des recherches spécifiques sont réalisées en fonction d'une exposition particulière des donneurs.
- En cas de don de sperme, cette recherche est renouvelée, à l'exception des marqueurs HTLV1 et HTLV2, 6 mois après le don ou le dernier recueil, si les dons ont été réalisés à plusieurs dates. Les paillettes de sperme ne sont cédées qu'à l'issue du deuxième contrôle demeuré négatif pour les virus VIH1, VIH2, VHB, VHC.
- En cas de don d'ovocytes, ce deuxième contrôle est réalisé dès les premiers jours de la stimulation ovarienne. Le transfert d'embryons n'est réalisé que si les résultats de ce contrôle sont connus.
- Pour rappel, outre les analyses ci-dessus, il est nécessaire de pratiquer une spermoculture ainsi qu'une recherche de *Chlamydiae trachomatis* par amplification génique.
- Enfin, des examens supplémentaires sont éventuellement réalisés lorsque le donneur vit dans des régions à forte incidence de certaines maladies infectieuses ou est originaire de ces régions ou dont les partenaires sexuels ou les parents sont originaires de ces régions, ou lorsque des voyages exposent le donneur à des risques particuliers.

Accueil d'embryons

Les tests applicables sont ceux de l'assistance médicale à la procréation intraconjugale. Un contrôle est réalisé au moins 6 mois après la date de la conservation embryonnaire.

Contrôle des milieux de culture

Différents milieux sont utilisés pour le recueil et la conservation des spermatozoïdes et des ovocytes. Il est possible qu'après mise en contact des spermatozoïdes et des ovocytes, la fécondation n'ait pas lieu en raison d'une contamination du milieu par des bactéries. Dans ce cas, un contrôle bactériologique est réalisé à la demande du laboratoire de biologie de la reproduction, à la recherche de bactéries « communes » ou de mycoplasmes.

Pour la recherche de bactéries « communes », on peut ensemencer une gélose au sang (base Columbia ou trypticase-soja, enrichie de 5 % de sang de cheval ou de mouton) et une gélose type chocolat Polyvitex® ; une gélose lactosée type CLED peut être ajoutée.

Pour la recherche de mycoplasmes, il faut procéder comme indiqué pour un échantillon de sperme.

Pour en savoir plus

Arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation.

Arrêté du 3 août 2010 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation.

Arrêté du 2 juin 2014 modifiant l'arrêté du 3 août 2010 modifiant l'arrêté du 11 avril 2008 relatif aux règles de bonnes pratiques cliniques et biologiques d'assistance médicale à la procréation.

Boitrelle F, Robin G, Lefebvre C, et al. Bacteriospermia in assisted reproductive techniques : effects of bacteria on spermatozoa and seminal plasma, diagnosis and treatment. Gynecol Obstet Fertil 2012 ; 40 : 226–34.

Orientation générale

M.-C. Ploy, F. Denis

Il serait présomptueux de proposer un schéma simple, unique, dichotomique permettant, à partir de paramètres de base, de parvenir au diagnostic de famille, voire de genre et pourquoi pas d'espèce. En fait, une telle approche diagnostique est du domaine du rêve.

En attendant une approche diagnostique unique identifiant tous les germes et leur sensibilité aux antibiotiques, sans culture, directement sur produits pathologiques à l'aide de puces, le recours à différents paramètres même simples essentiels pour l'orientation est faillible du fait des microbiologistes et des bactéries.

Selon le produit pathologique traité, les milieux de culture utilisés (simples, riches, enrichis en facteurs de croissance, sélectifs), l'atmosphère et la température de culture, certains germes ou espèces seront favorisés ou handicapés.

La morphologie bactérienne constitue toujours une étape essentielle (Fig. 26.1), qu'elle soit recherchée directement sur produit pathologique ou sur culture. L'aspect en cocci, bacilles droits ou spiralés, les groupements ou les caractères tinctoriaux peuvent varier ; ainsi, l'aspect n'est pas toujours tranché entre un cocci et un coccobacille. À partir du caractère tinctorial du Gram lui-même, il n'est pas toujours facile de classer les germes en positif ou négatif. Chacun se souvient de corynébactéries vite décolorées, de *Gardnerella* ou de *Bacillus* au Gram douteux.

Les traités classiques d'identification – *Bergey's Manual*, ouvrage de Cowan et Steel, ou de l'American Society for Microbiology – se gardent de proposer une approche simplifiée, abordant séparément, sur la base de la morphologie, les cocci, les bacilles selon leur caractère Gram positif ou négatif, le métabolisme respiratoire (oxydase, catalase) (Fig. 26.2 et Fig. 26.3), les caractères aérobies, anaérobies, aéro-anaérobies, les métabolismes des sucres oxydatifs, fermentatifs, oxydofermentatifs, etc., laissant à part les bactéries anaérobies strictes, les mycobactéries, les germes de culture difficile, exigeants, voire « fastidieux » – sacrifiant à un anglicisme, même si ces « fastidieux » sont souvent les plus intéressants.

Pour tenter d'aider les microbiologistes débutants, en ayant conscience des limites de cette approche préhistorique (qui se situe à des années-lumières de la taxonomie moderne développée dans le chapitre suivant), nous proposerons

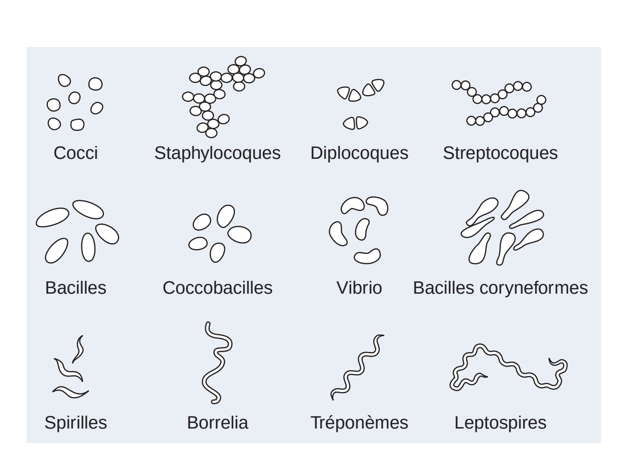


Fig. 26.1 Différents aspects de la morphologie bactérienne.

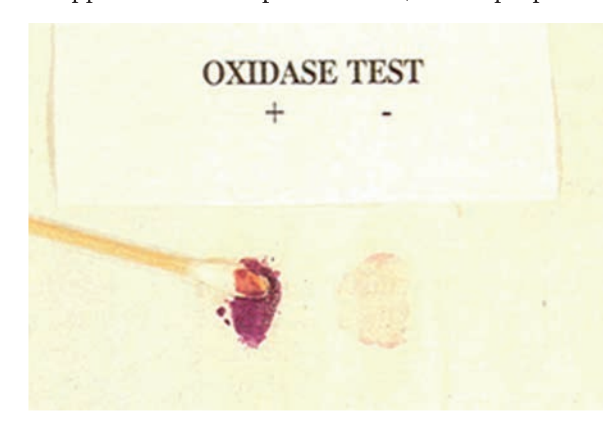


Fig. 26.2 Test de l'oxydase.

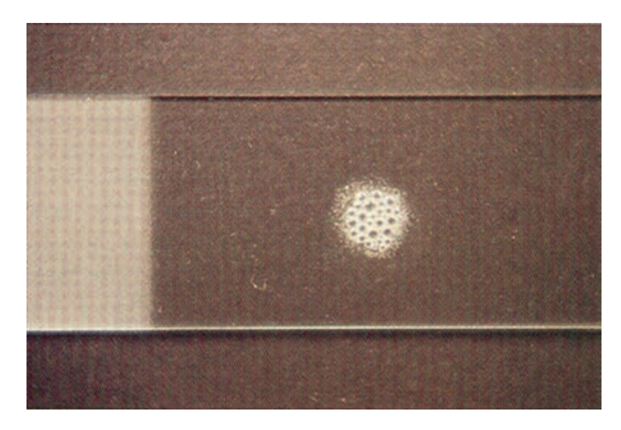


Fig. 26.3 Test de la catalase.

une approche dichotomique (peu scientifique, mais utile) concernant les cocci et les bacilles à Gram positif et à Gram négatif, permettant une orientation (bacilles à Gram négatif [Fig. 26.4], bactéries à Gram positif [Fig. 26.5], cocci à Gram négatif [Fig. 26.6]), à l'exclusion des anaérobies stricts et des bacilles acido-alcoolo-résistants.

Ces tableaux ne sont pas exhaustifs et il convient de se référer à chaque chapitre, traitant de la famille, du genre voire de l'espèce suspectée, ainsi que des sérotypes, des biotypes voire de l'approche diagnostique par d'autres voies génomiques, protéomiques, voire sérologiques.

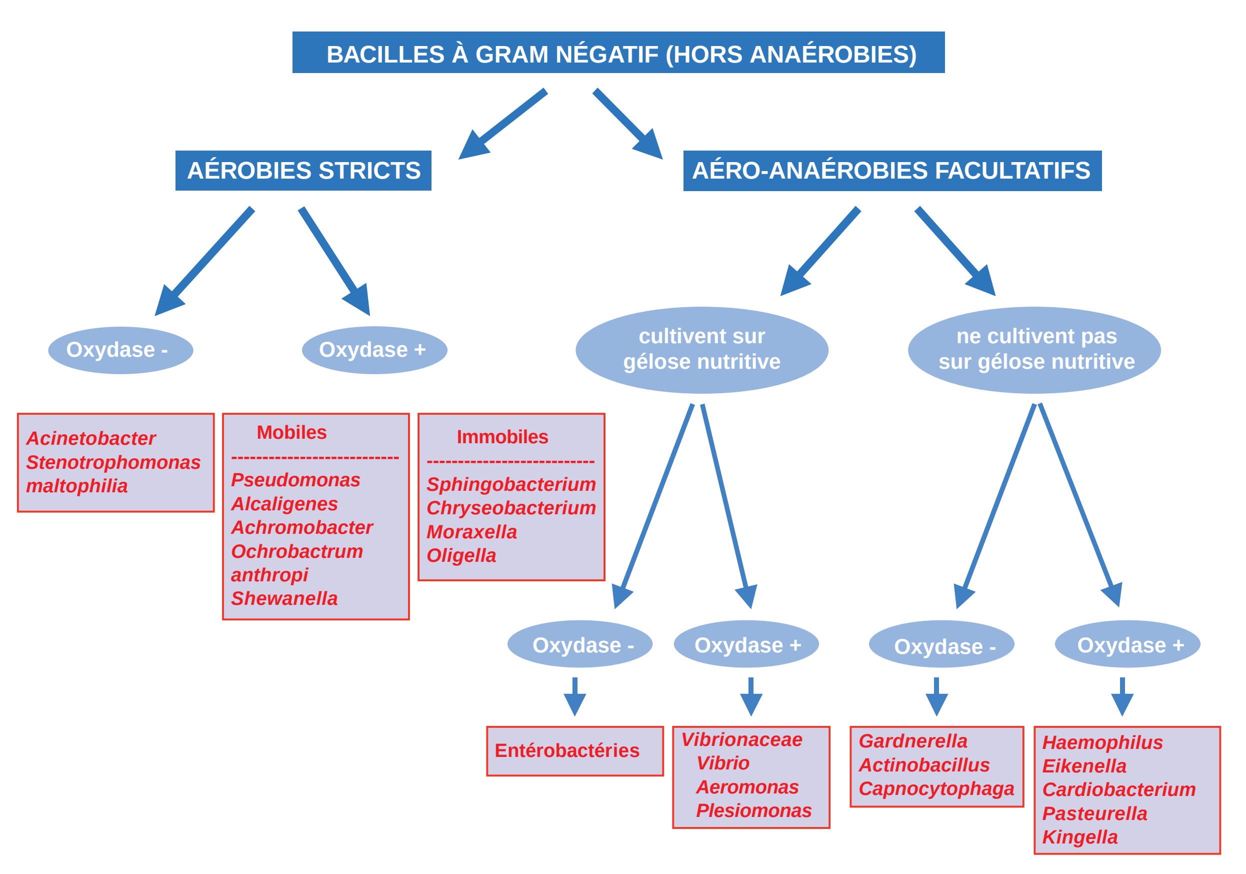


Fig. 26.4 **Bacilles à Gram négatif.**

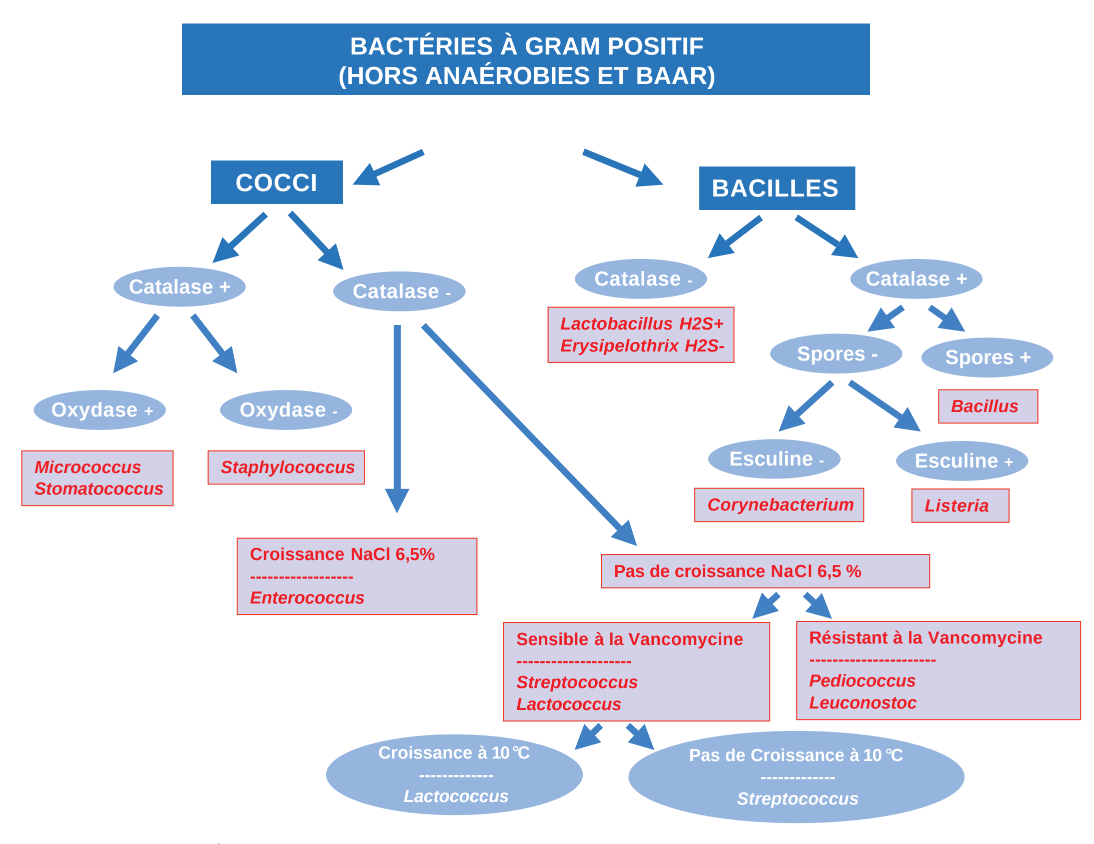


Fig. 26.5 **Bactéries à Gram positif.**

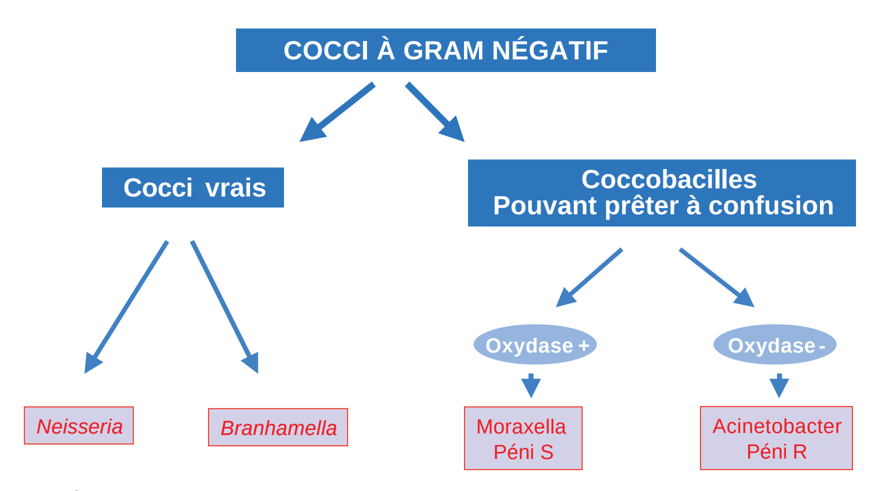


Fig. 26.6 **Cocci à Gram négatif.**

Chapitre 27

Taxonomie bactérienne à l'heure des technologies nouvelles de la taxonomie polyphasique à la taxogénomique

G. Durand, A. Van Belkum

PLAN DU CHAPITRE

Introduction : la taxonomie et le concept d'espèce

Depuis la première description de bactéries vivantes par Anthonie Van Leeuvenhoek en 1665 jusqu'à la fin du XIX[e] siècle, il n'y eut que peu d'intérêt pour l'identification des espèces bactériennes et leur classification. Leur étude n'a véritablement commencé qu'avec la découverte de leur rôle dans les processus de fermentation et de leur mode de transmission en pathologie infectieuse grâce aux travaux de Louis Pasteur et de Robert Koch. C'est le naturaliste suédois Carl von Linné (1707–1778) qui fonda la science du classement des organismes vivants appelée taxonomie (du grec *taxis*, arrangement), et le premier ouvrage « moderne » de classification bactérienne parut en 1923 avec le *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. La taxonomie permet de différencier les organismes vivants en définissant les limites aux groupes à l'intérieur desquels les organismes seront rassemblés sur la base de leurs caractères communs ou distinctifs, caractères principalement liés à la morphologie, à la niche écologique ou encore à la physiologie. La taxonomie se subdivise en trois parties : (1) la classification, c'est-à-dire l'arrangement des organismes dans des groupes taxonomiques ou « taxons » sur la base de la similarité de leurs caractères, (2) la nomenclature, c'est-à-dire la dénomination de ces groupes selon des règles strictes, et (3) l'identification, c'est-à-dire la comparaison des caractères d'un organisme inconnu à ceux des différents groupes décrits permettant alors de l'assigner à l'un d'entre eux.

Un taxon regroupe différents organismes dans le groupe qu'il constitue. L'élément de base est l'espèce. On considère alors des taxons d'espèce (par exemple espèce *Escherichia coli*), de genre (genre *Escherichia*), de famille (famille des *Enterobacteriaceae*), d'ordre (ordre des *Enterobacteriales*), de classe (classe des *Gammaproteobacteria*), de phylum (phylum des *Proteobacteria*) et de domaine ou encore appelé taxon de super-règne (*Bacteria*).

En bactériologie clinique, l'identification d'une bactérie responsable d'une pathologie infectieuse permet d'en déduire l'ensemble des caractéristiques écologiques, épidémiologiques et thérapeutiques se rapportant au taxon. La taxonomie bactérienne, discipline relativement récente, s'est

développée principalement au cours du siècle dernier et n'a réellement atteint sa maturité qu'avec l'avènement de la biologie moléculaire étudiant les motifs de séquences d'acide nucléiques. Cependant, la taxonomie reste un domaine en constante évolution avec la découverte régulière de nouvelles espèces ou encore la révision des frontières entre les espèces [12]. La classification bactérienne se trouve régulièrement mise à jour sur le site internet www.bacterio.net et les nouvelles espèces sont publiées dans la revue *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM).

Comme pour la plupart des autres formes de vie, la taxonomie bactérienne a été initialement fondée sur des caractères phénotypiques, principalement morphologiques. Par exemple, le genre *Staphylococcus* a été nommé ainsi sur son apparence en forme de grappes de raisin au microscope après coloration de Gram. La distinction de l'espèce *Staphylococcus aureus* des autres espèces de staphylocoques à coagulase négative a été établie sur la coloration jaunâtre (liée au pigment caroténoïde) de ses colonies sur des milieux de culture synthétiques. Beaucoup d'observations similaires fondées sur la morphologie, la coloration ou encore les effets d'hémolyse des colonies sur les milieux de culture ont conduit dans les années 1950 à une définition complexe de la notion d'espèce. L'avènement de la « culturomique », approche fondée sur l'utilisation de plus de 200 conditions de culture différentes permettant la croissance synthétique de micro-organismes jusqu'alors qualifiés de non cultivables [14], a encore significativement complexifié la notion d'espèce. Au cours du siècle dernier, de nombreuses technologies ont été utilisées dans l'analyse comparative de souches bactériennes pour la délimitation d'espèces. La technologie clé, toujours considérée comme un standard de l'*International Committee on Systematics of Prokaryotes* (ICSP), est l'hybridation ADN/ADN (*DNA-DNA hybridization* [DDH]). Cette méthode, au cours de laquelle la totalité du génome bactérien est hybridée, permet de mesurer un pourcentage de similitude entre deux molécules d'ADN. Pour les génomes bactériens, on estime qu'une hybridation à 70 % ou un ΔTm (différence de températures de demi-dénaturation à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme simple brin) de 4 à 5 °C correspond à une homologie de séquence de 96 %. Une espèce peut donc se définir comme le rassemblement de souches ayant des relations ADN/ADN qui se traduisent à la fois par des valeurs d'hybridation supérieures à 70 % et une instabilité thermique des hybrides inférieure ou égale à 5 °C. Néanmoins, cette méthode ne permet que la comparaison d'ADN deux à deux et les taxonomistes s'accordent sur le besoin d'une approche modernisée intégrant un plus grand nombre de données issues d'approches expérimentales multiples.

L'approche taxonomique utilisée de nos jours est la taxonomie dite « polyphasique » ou encore « mixte et consensuelle » prenant en compte le maximum de techniques possibles, phénotypiques, chimiotaxonomiques et moléculaires dans le but d'obtenir une résolution fine des différents groupes bactériens. Sa description intervient pour la première fois en 1970 par Colwell et al. [5], mais elle a été réellement mise en avant par Vandamme et al. en 1996 [25]. Tout en intégrant les données phénotypiques et chimiométriques, la taxonomie polyphasique se fonde sur l'analyse des séquences d'ARN ribosomal (ARNr), principalement de l'unité 16S. En 1987, Carl Woese émet l'hypothèse que l'évolution s'effectue à un rythme quasi indépendant des changements de phénotypes. Les gènes d'ARN ribosomaux codent pour des molécules constantes et universelles et qui ne sont pas sous contrainte de la pression de sélection. On considère alors que les mutations des ARNr au cours du temps ont été constantes puisqu'elles ne conféraient pas d'avantages sélectifs. Selon le paradigme de Woese [26], les séquences d'ARNr 16S doivent avoir plus de 97 % de similitude au sein d'une même espèce. Des souches dont les séquences d'ARNr 16S possèdent moins de 97 % de similitude ne font donc pas partie de la même espèce ; en revanche, l'inverse n'est pas vrai et, dans la pratique courante, l'intérêt du séquençage 16S devient alors vite limité lorsque les organismes sont très proches.

Les taxonomistes s'accordent sur la nécessité de revisiter la taxonomie et de moderniser les outils, grâce notamment à l'utilisation de nouvelles technologies comme le séquençage du génome complet (*whole genome sequencing* [WGS]) qui a déjà permis la découverte et la caractérisation de milliers d'espèces d'origine clinique ou environnementale [21, 22, 24].

L'objectif de ce chapitre consiste à décrire les tendances actuelles pour la taxonomie bactérienne, et la transition dans les années à venir de la taxonomie polyphasique comme nous la connaissons actuellement vers ce que nous pourrons appeler la « taxogénomique », taxon « omique » ou encore la « génotaxonomique ».

Aspects de la variation bactérienne

La description d'une espèce est assortie du dépôt d'une souche type de l'espèce dans au moins deux collections internationales. Cependant, au sein d'une espèce, des variants peuvent coexister qui se différencient de l'espèce type par des caractères mineurs et stables. La variation bactérienne est en réalité un processus fondamental dans le cycle de vie bactérien. Elle est causée par la sélection des variants les plus appropriés à partir d'un ensemble de mutants qui émergent spontanément du fait d'échecs partiels de réplication de l'ADN, l'ADN polymérase n'étant pas une enzyme infaillible. Des mutations peuvent apparaître de manière relativement fréquente avec des polymorphismes sur un seul nucléotide (*single nucleotide polymorphism* [SNP]), ou encore des insertions ou des délétions dans l'ADN génomique, générant des populations cellulaires hétérogènes au sein de la même souche. Des plasmides peuvent être perdus ou amplifiés durant la réplication, et des éléments génétiques mobiles peuvent changer de localisation ou bien voir modifier leur nombre de copies. De même, des bactériophages peuvent être intégrés ou activés en fonction des conditions physiologiques. L'échange et l'acquisition d'ADN sont des processus relativement fréquents (dépendant de l'espèce bactérienne ou du type), facilitant l'adaptation environnementale et l'échappement aux agents stressants. Ces phénomènes surviennent fréquemment dans les communautés bactériennes, y compris au sein des biofilms. Les changements dans l'arsenal génétique peuvent alors conduire à un phénotype plus ou moins désirable qui sera sélectionné par la pression environnementale. Par l'intermédiaire d'un

processus communément appelé « goulot d'étranglement », on peut voir apparaître de nouveaux variants bactériens. L'émergence constante de variants bactériens résistants aux antibiotiques ou aux antiseptiques courants illustre bien ce processus continu de sélection. Cette pression de sélection conduit à une diversification des génotypes et phénotypes bactériens à l'origine de la diversité des espèces bactériennes connues actuellement ou encore non identifiées.

Taxonomie polyphasique

La taxonomie polyphasique comprend deux types d'informations : le phénotype et les informations génomiques. La taxonomie fondée sur le phénotype étudie la morphologie bactérienne (forme, présence de flagelles, aspects tinctoriaux comme la coloration de Gram, sporulation, etc.), l'aspect des colonies (couleur, taille, forme, etc.), la physiologie (croissance à différentes températures et dans différentes conditions atmosphériques, pH, concentration en sel, sensibilité à un bactériophage, etc.). La chimiotaxonomie fondée sur des techniques d'analyse biochimique comme l'électrophorèse ou la chromatographie fait partie de l'analyse phénotypique. Elle a permis une grande avancée dans la taxonomie en étudiant les différents constituants biochimiques (acides aminés, sucres, lipides) de la cellule bactérienne ou de sa paroi. Elle comprend entre autres l'analyse des acides gras cellulaires (analyse FAME, ou *fatty acid methyl ester*), des acides mycoliques pour les mycobactéries, des lipides polaires, des quinones, des polyamines ou encore des exopolysacharides. Comme nous l'avons évoqué, l'hybridation ADN-ADN a été la première technologie moléculaire utilisée à des fins taxonomiques. Au cours des trois dernières décennies, d'autres méthodes moléculaires ont été introduites. Ces méthodes sont dites de première génération lorsqu'elles reposent sur l'analyse de l'ADN entier comme l'approche RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), dont le typage ribosomal, l'électrophorèse en champ pulsé (*pulsed field gel electrophoresis* [PFGE]) ou encore les sondes à ADN. Elles sont dites de deuxième génération quand elles consistent à amplifier des fragments d'ADN spécifiques au moyen de la PCR telles les approches par AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), AP-PCR (*arbitrarily-primed PCR*), rep-PCR (*repetitive extragenic palindromic-PCR*), RAPD (*random amplification polymorphic DNA*), analyse de l'ADNt, VNTR (*variable number of tandem repeat*) et LMVA (*multiple loci VNTR analysis*).

Au final, les analyses phénotypiques et moléculaires peuvent conduire individuellement ou de façon combinée (polyphasique !) à l'identification d'espèces bactériennes nouvelles ou préexistantes. Cependant, la taxonomie polyphasique dans son format actuel peut parfois échouer dans la dénomination de nouvelles espèces bactériennes. Vandamme et al. [25] suggèrent alors que la taxomonie moderne devrait s'appuyer sur le séquençage du génome complet en association avec des données phénotypiques et biochimiques. La principale difficulté réside dans l'acceptation de cette nouvelle approche taxonomique de façon consensuelle comme l'outil principal et supportant le code international de nomenclature bactérienne.

Les technologies « omiques » comme outils taxonomiques (taxon « omiques »)

Face à la masse de données générées au cours des analyses taxonomiques, Vandamme et al. [25] avaient conclu dès 1996 que « la taxonomie dite synthétique serait rendue possible par le développement de nouvelles stratégies mathématiques et informatiques ». Cette affirmation visionnaire est devenue maintenant une réalité avec l'émergence des technologies « omiques » telles que la protéomique, la génomique, la transcriptomique, la lipidomique, la glycomique qui ont considérablement modifié l'étendue des données analysables.

À l'ère du *big data*, l'explosion de la quantité de données nécessite des technologies d'interprétation à haut débit. Pour toutes les méthodes analytiques à visée taxonomique vues précédemment, un point de mesure unique a été converti en un large ensemble de données. Par exemple, alors que la chromatographie en phase gazeuse était auparavant utilisée pour des analyses très limitées, de nouvelles approches, en particulier celles couplées à la spectrométrie de masse (*mass spectrometry* [MS]), facilitent la détection, l'identification et la quantification de molécules parfois au niveau d'une cellule unique. La combinaison de diverses technologies « omiques » autorise un inventaire quasi exhaustif de toutes les catégories de molécules cellulaires et de leurs représentants individuels. Cependant, reste à définir quelles molécules ou quelle combinaison de molécules fournissent la meilleure plateforme analytique pour l'identification des espèces. Finalement, les technologies omiques montreront que beaucoup d'entités appelées espèces aujourd'hui seraient en réalité des hybrides d'autres espèces. Bien que de nombreux chercheurs voient les données omiques comme déterminantes dans la définition des espèces, les valeurs de seuil de « variabilité autorisée » devront être mieux définies. Quel devrait être le nombre commun de pics dans un chromatogramme ou bien de changements de nucléotides au sein de séquences d'ADN pour statuer que deux isolats appartiennent bien à la même espèce ? C'est ce paramètre quantitatif qui reste à définir et qui devra être accepté en dernier ressort par les taxonomistes du monde entier comme le critère de définition d'espèce.

La protéomique et la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour la taxonomie bactérienne

L'introduction récente de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans les laboratoires de microbiologie médicale a révolutionné l'identification des micro-organismes isolés d'échantillons biologiques et environnementaux. Les systèmes commerciaux mettant en œuvre cette technologie sont MALDI BioTyper® de Bruker Daltonics et VITEK® MS, de bioMérieux.

La spectrométrie de masse, technologie fondée sur l'ionisation des échantillons, étudie le déplacement d'entités ioniques dans des champs électromagnétiques et permet l'identification des micro-organismes grâce à l'analyse de leur contenu protéique. Une colonie bactérienne ou fongique est étalée sur une cible, recouverte d'une matrice ionisante et bombardée par un laser. Les ions ainsi générés sont séparés en fonction de leur temps de vol (*time of flight* [TOF]), c'est-à-dire la mesure du temps qu'ils mettent pour parcourir la longueur du tube de vol. Lorsqu'ils sont soumis à une tension accélératrice. La zone de vol se situant hors du champ électrique, la séparation des ions ne dépend que de la vitesse acquise lors de la phase d'accélération. Ainsi, les ions avec un rapport masse sur charge (*m/z*) le plus petit parviendront au détecteur en premier. Pour chaque groupe d'ions de même rapport *m/z*, un signal est enregistré au niveau du détecteur sous la forme d'une fonction temps/intensité ; l'ensemble des pics ainsi enregistrés constitue un spectre de masse. La source d'ions de type MALDI, source dite « douce », permet la formation d'espèces ioniques principalement monochargées ; la séparation des ions ne dépend ainsi que de leur masse. Parmi les nombreux pics produits, les principaux correspondent à des protéines ribosomales, spécifiques d'espèce et peu influencées par les variations intraspécifiques. Les spectres générés à partir de bactéries entières sont ensuite comparés aux spectres de référence de la base de données d'un système expert. Ces spectres de référence ont été obtenus à partir des souches types et d'isolats cliniques issus de collections internationales. En résumé, les profils de pics sont spécifiques d'espèces et parfois même spécifiques d'une sous-espèce ou d'un type [7]. Bien que la majorité des protéines détectées par MALDI-TOF MS soient d'origine ribosomale, d'autres protéines hautement exprimées peuvent être détectées comme les ADN et ARN polymérases ainsi que des enzymes impliquées dans la synthèse des protéines. Ainsi, toute forme de taxonomie liée à cette technologie possède les mêmes avantages et inconvénients que la taxonomie fondée sur les gènes d'ARNr, en tenant compte que la contribution de protéines non ribosomales reste très limitée. Bien que les microbiologistes cliniques aient largement plébiscité la spectrométrie de masse en raison de la simplicité des procédures et de la fiabilité de l'identification des espèces bactériennes, la technologie en elle-même ne permettra pas une étude taxonomique bactérienne de façon autosuffisante. Cependant, grâce aux bases de données contenant les spectres de référence de centaines d'espèces bactériennes, une taxonomie dite « pratique » peut être mise en œuvre en routine dans le laboratoire de microbiologie. La technologie possède une résolution qui n'a pas été exploitée à son maximum et la base de données des espèces embarquée dans le système n'est pas encore exhaustive. Des améliorations dans l'interprétation des données au même titre que des évolutions technologiques sont envisagées, comme l'amélioration de la résolution. Les technologies analytiques comme la chromatographie en phase gazeuse ou liquide trouveront des applications sur le terrain en combinaison avec la MS. Néanmoins, à ce jour, le manque de multiplexage et le coût des équipements sont prohibitifs par rapport à la généralisation de leur application.

La génomique pour la taxonomie bactérienne (génotaxonomique)

La technologie du séquençage de dernière génération (*next generation sequencing* [NGS]) a fortement évolué au cours de ces quelques dernières années tout en révolutionnant l'analyse génomique et en offrant de nouvelles opportunités diagnostiques dans les laboratoires de microbiologie clinique [8]. De nouveaux génomes microbiens sont séquencés tous les jours, permettant la constitution de vastes bases de données accessibles dans le domaine public de génomes entiers ou de séquences de gènes individuels (Tableau 27.1). La possibilité de caractériser des communautés microbiennes complètes en s'affranchissant de l'étape de culture a ouvert les domaines devenus très populaires de la métagénomique et de l'analyse du microbiome que nous détaillerons plus loin. Le microbiote humain est désormais considéré comme un organe à part entière, plutôt que comme une collection de micro-organismes. Le NGS a permis de dévoiler des informations sur les interactions entre le micro-organisme et son hôte, la littérature médicale regorgeant d'exemples illustrant la manière dont cette technologie peut être utilisée à des fins de diagnostic clinique ou pour l'étude des pathogènes. Cependant, l'introduction du NGS dans la pratique médicale ne pourra se faire rapidement en raison de nombreux challenges, tels que la nécessité de réaliser des essais cliniques, l'absence actuelle de cadre réglementaire ou bien l'adaptation nécessaire de la technologie à l'environnement clinique. Le NGS demeure une technologie coûteuse et complexe dont le temps de rendu des résultats se compte encore en jours plutôt qu'en heures, et dont l'interprétation des résultats demeure délicate, nécessitant une expertise très pointue. Toutefois, les communautés scientifiques, du diagnostic et de la taxonomie s'accordent sur le fait que le NGS sera au centre de futurs développements de tests diagnostiques.

Les séquences génomiques, et plus particulièrement celles issues de génomes entiers, sont considérées comme des informations optimales pour la taxonomie. Le séquençage génomique existe depuis des décennies ; la technologie désormais obsolète de séquençage chimique « Maxam et Gilbert » était déjà utilisée à des fins taxonomiques. Faisant suite à la méthode de séquençage enzymatique de Sanger, dite de terminaison de chaînes, l'avènement de nouvelles générations de séquençage a permis d'accroître à la fois la vitesse et le rendement tout en réduisant les coûts de manière significative. Des technologies encore plus sophistiquées dites de 3e ou 4e génération, telles que le séquençage par nanopore, sont en cours de développement et permettront l'utilisation de séquences de génomes entiers à des fins taxonomiques (Tableau 27.2).

Dans le cadre de la révision de la taxonomie, de nouvelles définitions sont nécessaires. Dans les débats sur la taxonomie génétique, une unité taxonomique opérationnelle (*operational taxonomic unit* [OTU]) est définie comme une espèce ou un groupe d'espèces s'appuyant seulement sur les données de séquences d'ADN disponibles. C'est l'unité de diversité microbienne la plus couramment utilisée [3]. La définition de l'OTU telle que donnée par le National Center for Biotechnology Information (NCBI) est la suivante :

Tableau 27.1 **Génomes d'espèces bactériennes, connues ou nouvelles, impliquées en pathologie infectieuse humaine publiés dans la revue *ASM Journal Genome Announcements* (novembre-décembre 2015).**

Espèce bactérienne	Connue ou nouvelle	Nombre de souches	Source
Acinetobacter baumannii	Connue	3	Bacteriémie
Bacillus anthracis	Connue	3	Anthrax cutané
Bacteroides periocalifornicus	Nouvelle	1	Periodontite
Bartonella ancashensis	Nouvelle	1	Bartonellose, *verruga peruana*
Bordetella pertussis	Connue	11	Coqueluche, souches échappant au vaccin
Burkholderia pseudomallei	Connue	1	Isolat clinique, multirésistant
Campylobacter jejuni	Connue	3	Syndrome de Guillain-Barré et gastro-entérite
Campylobacter ureolyticus	Connue	1	Infection génitale
Enterococcus faecalis	Connue	1	Souche de référence ERV (entérobactérie résistant à la vancomycine)
Escherichia coli	Connue	4	Septicémie
Famille des *Chitinophagaceae*	Nouvelle	1	Tumeur péritonéale
Francisella tularensis	Connue	1	Isolat humain
Gardnerella vaginalis	Connue	1	Infection génitale
Haemophilus influenzae	Connue	8	Isolats cliniques
Klebsiella pneumoniae	Connue	1	Infection sur cathéter par voie veineuse centrale
Mycobacterium chimaera	Nouvelle (ou variant)	3	Sécrétions respiratoires
Mycobacterium mucogenicum	Nouvelle	1	Prélèvement respiratoire
Mycobacterium peregrinum	Nouvelle	1	Prélèvement respiratoire
Mycobacterium tuberculosis	Connue	2	Crachat, souche multirésistante
Porphyromonas gingivalis	Connue	2	Periodontite
Propionibacterium acnes	Connue	2	Hypomélanose maculaire progressive
Pseudomonas aeruginosa	Connue	4	Infection respiratoire
Salmonella enterica	Connue	3	Gastro-entérite, souche multirésistante
Serratia marcescens	Connue	1	Infection urinaire
Serratia rubidaea	Connue	1	Infection opportuniste
Staphylococcus aureus	Connue	1	Souche de référence SASM (*S. aureus* sensible à la méticilline)
Yersinia pestis	Connue	19	Peste
27 espèces bactériennes	**6 nouvelles**	**81 souches**	

« le niveau taxonomique d'échantillonnage sélectionné par l'utilisateur pour être utilisé dans une étude, comme les individus, les populations, les espèces, les genres ou les souches bactériennes ». Wooley et al. [27] proposent la définition suivante : « l'unité taxonomique opérationnelle, distinction des espèces en microbiologie utilisant l'ARNr et un seuil de pourcentage de similarité pour classer les microbes dans le même ou dans des OTU différents ». Les OTU sont donc des unités taxonomiques importantes dans la taxonomie génomique. Bien que la notion d'OTU ne soit pas utilisée de façon très homogène, cette notion définit les caractéristiques de base de la taxogénomique que nous allons évoquer ci-dessous.

Les séquences de génomes complets peuvent être générées pour n'importe quelle espèce bactérienne cultivable ou pour laquelle une biomasse suffisante peut être obtenue. Même si la spectrométrie de masse MALDI-TOF semble aujourd'hui être la méthode la plus pratique pour une étude à visée taxonomique, les données de séquences contiennent une telle masse d'informations biologiques, fonctionnelles et taxonomiques que la majorité des taxonomistes sont convaincus que le séquençage de génomes complets sera la source ultime d'informations avec lesquelles un cadre taxonomique final pourra être construit.

Tableau 27.2 **Comparaison des plateformes de séquençage nouvelle génération (*next generation sequencing* [NGS]) du génome complet (*whole genome sequencing* [WGS])*.**

Plateforme de séquençage	Illumina MiSeq® et HiSeq®	Ion Torrent PGM®	Pacific Bioscience PacBio RS®	Oxford Nanopore minION®
Mécanisme de séquençage	Étape de pré-amplification Séquençage par synthèse	Étape de pré-amplification Séquençage par synthèse sur semi-conducteur	Pas d'étape de pré-amplification Séquençage utilisant un marquage fluorescent	Pas d'étape de pré-amplification Séquençage par nanopore, détection par courant électrique
Longueur des « read »	≥ 150 pb	~ 200 pb	~ 1500 pb (≥ 1500 pb avec le nouveau robot)	~ 10000 pb max.
Rendement	~ 1,5–2 Gb pour MiSeq® 600 Gb max. pour HiSeq®	20–50 Mb (314 chip) 100–200 Mb (316 chip) 1Gb (318 chip)	100 Mb	> 500 Mb en 48 h
Temps/cycle (run)	27 h pour MiSeq® à 11 jours pour HiSeq®	2 h	2 h	Jusqu'à 3 jours mais premières données disponibles en quelques heures (≤ 6 h)
Préparation automatisée de la librairie	Oui	Oui	Protocole rapide disponible sans préparation de la librairie	Protocole de 2 h
Quantité d'ADN nécessaire	50–1000 ng	100–1 000 ng	~ 1 µg	20 ng min.
Taux d'erreurs	0,8 % pour MiSeq® 0,3 % pour HiSeq®	1,7 %	12,8 %	5–40 %

* Il est important d'insister sur le fait que cette table ne représente qu'un instantané au jour de sa création et ne sert qu'à un but comparatif puisque chacune des technologies mentionnées ci-dessus évolue à une vitesse incompatible avec la mise en place d'un tableau à la fois exhaustif et en permanence à jour.
D'après Quail MA, Smith M, Coupland P, et al. A tale of three next generation sequencing platforms : comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC Genomics 2012 ; 13 : 341 ; et Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. J Biomed Biotechnol 2012 ; 2012 : 251364), ainsi que d'autres données publiques sur internet disponibles à ce jour (www.molecularecologist.com/next-gen-fieldguide-2014/).

Dans le cadre de l'utilisation des séquences génomiques en taxonomie, il existe toutefois différents points critiques : (1) les souches types utilisées doivent être soigneusement choisies ; (2) la base de données de référence doit être fiable ; (3) les OTU doivent être clairement définies ; (4) les outils d'analyse comparative pour vérifier si une nouvelle séquence est proche (ou pas) d'une séquence de référence doivent être clairement spécifiés. Afin d'établir des comparaisons génomiques fiables, la plupart des taxonomistes préfèrent séparer les séquences génomiques dans différentes catégories : les core-gènes (partagés par tous les isolats d'une espèce donnée), les core-gènes variables (ceux qui varient significativement mais uniformément présents dans une espèce), les gènes variables (faisant partie du pangénome, représentant l'accumulation de tous les gènes présents dans une espèce plutôt qu'une souche de cette espèce, mais présents de façon sélective dans une fraction de ces génomes) et les éléments génétiques mobiles qui doivent être considérés à part pour une taxonomie optimale. On constate actuellement une tendance nette vers l'utilisation de core-gènes pour l'ordonnancement taxonomique [9, 15, 23]. Le nombre de gènes utilisés pour ces analyses peut varier selon l'espèce, mais habituellement il n'excède pas 1 000 gènes [18]. La question principale reste la définition d'une identification au niveau de l'espèce qui soit utilisable. Dans le passé, une valeur de seuil de 97 % d'homologie de l'ARN ribosomal était utilisée, ou bien une valeur de 70 % d'hybridation ADN-ADN, mais les nouvelles technologies à haut débit exigent des méthodes de calcul plus sophistiquées et innovantes [4]. Toutefois, une approche simple consiste à calculer la moyenne d'identité de nucléotides (*average nucleotide identity* [ANI]) [13] pour laquelle une valeur de 70 % d'hybridation ADN-ADN se traduit par une ANI comprise entre 95 et 96 % [17]. De façon alternative, la distance phylogénique entre génomes fondée sur des technologies classiques d'alignement de génome BLAST (*basic local alignement search tool*) constitue un outil pouvant être utilisé même sans avoir recours à l'annotation de génome [10]. Beaucoup d'autres systèmes ont été développés. La plupart utilisent des séquences annotées et fondent l'analyse phylogénique sur la comparaison directe des séquences pour lesquelles la stabilité phylogénétique et taxonomique peut être déduite d'après les restrictions structurales et/ou fonctionnelles des protéines impliquées. La plupart de ces méthodes s'apparentent au séquençage multilocus (*multi locus sequence typing* [MLST]) dont les données générées peuvent être calibrées au niveau de l'espèce mais aussi au niveau de la sous-espèce ou de la souche [15, 20]. La MLST classique nécessitant habituellement entre 2 et 10 gènes se trouve largement dépassée depuis par la MLST génomique qui peut utiliser des milliers de gènes en fonction de la taille du core-génome de l'espèce.

Beaucoup d'optimisations sont attendues dans les années à venir. Les données génomiques doivent être classées, référencées et cumulées avec d'autres informations comme les

données cliniques, démographiques, environnementales et aussi épidémiologiques. Les grandes initiatives publiques sont déjà engagées dans le développement de ces ressources et leur accessibilité dans le domaine public via des programmes nationaux ou internationaux tels que le programme européen COMPARE (www.compare-europe.eu).

À terme, la spectrométrie de masse permettra de détecter une nouvelle espèce potentielle et l'analyse ultérieure du génome viendra définitivement confirmer l'existence de cette nouvelle espèce [6].

Pertinence de la métagénomique pour l'évolution de la taxonomie bactérienne

La notion de génotaxomique que nous avons introduite précédemment est fondée sur la disponibilité de séquences de génomes « purs » obtenus à partir de souches microbiennes préalablement cultivées, isolées et caractérisées. Or, des séquences de génomes entiers ou partiels peuvent être générées pour des espèces pour lesquelles des quantités limitées de biomasse sont obtenues et qui ne sont disponibles que dans des échantillons polymicrobiens ou au sein de cultures mixtes. Une large fraction des bactéries terrestres n'a pas encore été cultivée, et donc isolée, puisque les conditions optimales de culture de ces bactéries n'ont pas encore été déterminées. La caractérisation de nouveaux procaryotes directement issus d'un mélange sans culture préalable, soit par le séquençage de leur ARN ribosomaux, soit par le séquençage de leur ADN total extrait et purifié, est appelé métagénomique. La métagénomique permet de connaître le métagénome, c'est-à-dire l'ensemble des génomes des micro-organismes qui proviennent d'une même niche écologique. Quand l'approche ribosomale est utilisée, les espèces peuvent être cataloguées (et quantifiées) sur la base (du nombre) des séquences lues couvrant la séquence du gène ribosomal. Cette approche est quasi équivalente à la procédure classique de taxonomie fondée sur l'ARNr 16S utilisée au siècle dernier. L'approche par séquençage des ADN totaux grâce au NGS est plus avancée mais crée de nouveaux challenges bio-informatiques. La métagénomique permet la découverte de nouvelles espèces bactériennes, potentiellement des pathogènes humains, mais aussi la découverte de capacités physiologiques inconnues jusqu'alors pour certaines espèces [16]. La procédure de séquençage ne constitue que la première étape d'une longue série pour finaliser la caractérisation. De nombreux projets de métagénomique utilisent des protocoles standard d'analyses génomiques : séquencer le plus possible (on parle de profondeur de séquençage, chaque morceau d'ADN étant séquencé plusieurs dizaines de fois), assembler les lectures (petits morceaux d'ADN qu'on obtient en sortie d'un séquenceur) en morceaux plus grands, puis finalement annoter les séquences génomiques. Or, dans tout le processus, les espèces très faiblement représentées dans l'échantillon ont toutes les chances d'être considérées comme des artéfacts et ainsi ignorées ; cela peut mener à des biais lors de l'analyse des données. Comme la génomique et la métagénomique ne répondent pas à la même question, le logiciel d'interprétation pour l'analyse des données de métagénomique devient alors un élément crucial. Si la génération des données n'est plus un point limitant d'une étude métagénomique, c'est dorénavant l'analyse de ces gros jeux de données qui pose problème aux logiciels existants, et nécessite le développement de nouveaux logiciels [2]. Par exemple, pour toutes les lectures, on doit investiguer si elles appartiennent à un seul chromosome ou non. Le processus taxonomique requiert alors des temps de calculs très longs, exige du matériel sophistiqué et donc des budgets conséquents. Le filtrage et la curation des données constituent également des étapes critiques car le regroupement des OTU et l'annotation ne pourront être réalisés qu'en utilisant des données justes et avec des bases de données de référence fiables [1]. La revue de tous les logiciels disponibles va au-delà du cadre de ce chapitre, le lecteur intéressé pourra se référer à une revue récente sur ce sujet [19].

En conclusion, beaucoup d'outils mathématiques ont déjà été développés ces dernières années, mais des modules logiciels additionnels viendront à l'avenir optimiser et accélérer encore davantage l'interprétation des données dans le champ de la métagénomique.

Conclusion et perspectives

Les nouvelles biotechnologies nous font appréhender la taxonomie bactérienne sous une forme totalement différente. Avec une approche protéomique, il est possible d'interpréter des profils d'expression protéiques complexes avec une résolution inégalée jusqu'à ce jour. La protéomique nous aidera alors à analyser les protéines hautement exprimées au sein d'une espèce bactérienne à des fins de classification. L'approche génomique avec le séquençage du génome complet, quant à elle, autorise une comparaison de souches bactériennes à l'échelle du nucléotide. La transition d'une taxonomie polyphasique classique vers une forme de taxon« omique » gouvernée par le génome nécessitera un peu de temps et, afin de supporter et renforcer cette approche, l'association avec des données phénotypiques sera encore nécessaire. Nous sommes convaincus qu'un nouveau modèle de taxonomie est à établir de façon urgente, de même que, par exemple, la description du contenu du microbiome procaryotique humain nécessitera encore d'affiner les technologies [11]. Le NGS va pouvoir répondre à certaines exigences requises pour la mise en place d'un processus taxonomique « nouvelle génération ». Toutefois, la définition des critères concernant la délimitation des espèces requiert avant tout le soutien de l'ensemble des taxonomistes microbiens. En tout état de cause, l'établissement de ces nouvelles approches taxonomiques va augmenter de façon considérable les relations entre les disciplines scientifiques autrefois relativement distantes, qu'il s'agisse de la biologie, des mathématiques appliquées ou de la bio-informatique. Avec un peu de recul, si l'on regarde les récentes évolutions technologiques spectaculaires dans ce domaine, on peut sans doute considérer qu'il s'agit d'un véritable pas de géant pour une seule génération de taxonomistes…

Références

[1] Albanese D, Fontana P, De Filippo C, et al. MICCA : a complete and accurate software for taxonomic profiling of metagenomic data. Sci Rep 2015 ; 5 : 9743.

[2] Ames SK, Hysom DA, Gardner SN, et al. Scalable metagenomic taxonomy classification using a reference genome database. Bioinformatics 2013 ; 29(18) : 2253–60.

[3] Blaxter M, Mann J, Chapman T, et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2005 ; 360 : 1935–43.

[4] Chun J, Rainey FA. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. Int J Syst Evol Microbiol 2014 ; 64(Pt 2) : 316–24.

[5] Colwell RR. Polyphasic taxonomy of the genus Vibrio : numerical taxonomy of Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus, and related Vibrio species. J Bacteriol 1970 ; 104(1) : 410–33.

[6] Fournier PE, Lagier JC, Dubourg G, et al. From culturomics to taxonomogenomics : A need to change the taxonomy of prokaryotes in clinical microbiology. Anaerobe ; 2015.pii : S1075-9964(15)30071-8.

[7] Gilchrist CA, Turner SD, Riley MF, et al. Whole-genome sequencing in outbreak analysis. Clin Microbiol Rev 2015 ; 28(3) : 541–63.

[8] Goldberg B, Sichtig H, Geyer C, et al. Making the leap from research laboratory to clinic : challenges and opportunities for next-generation sequencing in infectious disease diagnostics. 2015 ; 6(6). pii : e01888-15.

[9] Haley BJ, Grim CJ, Hasan NA, et al. Comparative genomic analysis reveals evidence of two novel Vibrio species closely related to V. cholerae. BMC Microbiol 2010 ; 10 : 154.

[10] Henz SR, Huson DH, Auch AF, et al. Whole-genome prokaryotic phylogeny. Bioinformatics 2005 ; 21(10) : 2329–35.

[11] Hugon P, Dufour JC, Colson P, et al. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. Lancet Infect Dis 2015 ; 15(10) : 1211–9.

[12] Janda JM. Taxonomic update on proposed nomenclature and classification changes for bacteria of medical importance, 2013–2014. Diagn Microbiol Infect Dis 2015 ; 83 : 82–8.

[13] Konstantinidis KT, Tiedje JM. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. Proc Natl Acad Sci U S A 2005 ; 102(7) : 2567–72.

[14] Lagier JC, Armougom F, Million M, et al. Microbial culturomics : paradigm shift in the human gut microbiome study. Clin Microbiol Infect 2012 ; 18(12) : 1185–93.

[15] Mende DR, Sunagawa S, Zeller G, et al. Accurate and universal delineation of prokaryotic species. Nat Methods 2013 ; 10(9) : 881–4.

[16] Nielsen HB, Almeida M, Juncker AS, et al. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. Nat Biotechnol 2014 ; 32(8) : 822–8.

[17] Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. Proc Natl Acad Sci U S A 2009 ; 106(45) : 19126–31.

[18] Rosselló-Móra R, Amann R. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. Syst Appl Microbiol 2015 ; 38(4) : 209–16.

[19] Scheuch M, Höper D, Beer M. RIEMS : a software pipeline for sensitive and comprehensive taxonomic classification of reads from metagenomics datasets. BMC Bioinformatics 2015 ; 16 : 69.

[20] Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int J Syst Evol Microbiol 2002 ; 52(Pt 3) : 1043–7.

[21] Sutcliffe IC, Trujillo ME, Goodfellow M. A call to arms for systematists : revitalising the purpose and practises underpinning the description of novel microbial taxa. Antonie Van Leeuwenhoek 2012 ; 101(1) : 13–20.

[22] Sutcliffe IC, Trujillo ME, Whitman WB, et al. A call to action for the International Committee on Systematics of Prokaryotes. Trends Microbiol 2013 ; 21(2) : 51–2.

[23] Van Belkum A, Soriaga L, Akella S, et al. Phylogenetic distribution of CRISPR-Cas systems in antibiotic resistant Pseudomonas aeruginosa. mBio 2015 ; 6(6). e01796-15.

[24] Vandamme P, Peeters C. Time to revisit polyphasic taxonomy. Antonie Van Leeuwenhoek 2014 ; 106(1) : 57–65.

[25] Vandamme P, Pot B, Gillis M, et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol Rev 1996 ; 60(2) : 407–38.

[26] Woese CR. Bacterial evolution. Microbiol Rev 1987 ; 51 : 221–71.

[27] Wooley JC, Godzik A, Friedberg I. A primer on metagenomics. MBio 2015 ; 6(6). pii : e01888-15. doi : 10.1128/mBio.01888-15.

Sites internet

www.bacterio.net
www.the-icsp.org
http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem
http://genomea.asm.org

Chapitre 28

Cocci à Gram positif

F. Denis, C. Bouchiat, J. Loubinoux, et al.

PLAN DU CHAPITRE

28.1 Généralités

F. Denis

Les cocci à Gram positif font partie des flores commensales de la peau et des muqueuses chez l'homme. De ce fait, ils sont fréquemment isolés en bactériologie médicale, le problème étant de faire la part, lorsqu'une culture est positive, entre une situation pathogène et une contamination de l'échantillon par une bactérie commensale.

De nombreuses espèces sont maintenant bien définies; elles peuvent être aérobies, anaérobies strictes, anaérobies-aérotolérantes ou bien aérobies-anaérobies facultatives.

Deux familles jouent un rôle majeur en pathologie; ce sont les *Micrococcaceae* et les *Streptococcaceae*, qui peuvent être cultivées en atmosphère aérobie et différenciées (Tableau 28.1), notamment par deux caractères morphologique et enzymatique, la catalase (voir Figure 3.17). Il est à noter que les érythrocytes des géloses au sang possèdent une activité catalasique qui risque de donner une réaction faussement positive lorsque les colonies sont prélevées sur ce genre de milieu.

Tableau 28.1 Caractères distinctifs entre les représentants des deux familles : *Micrococcaceae* et *Streptococcaceae.*

	Morphologie	Catalase
Micrococcaceae	Cocci groupés en amas ou en courtes chaînettes	Positive
Streptococcaceae	Cocci en diplocoques ou en longues chaînettes	Négative

28.2 Familles des *Staphylococcaceae* et *Micrococcaceae*

C. Bouchiat, C. Dupieux, F. Garnier, F. Denis, F. Vandenesch

Suite à l'étude des groupes phylogéniques obtenus sur la base d'une analyse des séquences d'ADNr/ARNr 16S en 1997, la famille des *Micrococcaceae,* composée autrefois des genres *Micrococcus, Stomatococcus, Planococcus et Staphylococcus*, a été complètement restructurée. Elle est désormais constituée des genres *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Nesterenkonia*, *Renibacterium* et *Rothia.* De plus, le genre *Micrococcus* a été divisé en six nouveaux genres : *Arthrobacter* et *Nesterenkonia* (non isolés en pathologie humaine), *Micrococcus* et *Kocuria* (isolés de façon exceptionnelle en bactériologie médicale) et *Kytococcus* et *Dermacoccus* (relié à la famille des *Dermacoccaceae*, non isolés en pathologie humaine).

Le genre *Staphylococcus* est, lui, désormais rattaché à la famille des *Staphylococcaceae* (classe des Bacilli, ordre des Bacillales), avec les genres *Jeotgalicoccus, Macrococcus, Nosocomiicoccus* et *Salinicoccus.*

Les espèces retrouvées en pathologie humaine appartiennent presque exclusivement aux genres *Staphylococcus, Arthrobacter*, *Kocuria*, *Micrococcus* et *Rothia.*

Différenciation des genres *Staphylococcus, Arthrobacter, Kocuria, Micrococcus* et *Rothia*

Les bactéries des genres *Arthrobacter, Micrococcus* et *Kocuria* sont des cocci à Gram positif groupés en paires, tétrades ou en amas. Elles cultivent très bien sur milieux ordinaires à 37 °C ; en 24 heures ; les colonies de 1 à 2 mm de diamètre sont lisses, rondes, opaques et bombées. Les colonies peuvent être pigmentées en jaune doré ou jaune citrin et, sur gélose au sang, certaines souches sont hémolytiques. Elles sont aérobies strictes et immobiles. Le genre *Rothia* (anciennement *Stomatococcus*) correspond, lui, à des cocci à Gram positif capsulés.

Genres *Micrococcus, Arthrobacter, Kocuria* et *Rothia*

Les « microcoques » (*Arthrobacter, Micrococcus* et *Kocuria*) sont retrouvées dans l'environnement et font partie de la flore cutanée transitoire de l'homme. Le genre *Rothia* est, lui, un commensal du tractus respiratoire de l'homme et des muqueuses gingivales, oropharyngées et conjonctivales. Occasionnellement rencontrés en pathologie humaine, ils sont le plus souvent responsables d'infections opportunistes. De rares cas d'infection sur cathéter, de méningite sur dérivation ventriculo-péritonéale ou encore d'endocardite infectieuse chez des patients immunodéprimés ont été décrits.

Genre *Staphylococcus*

En 2015, le genre *Staphylococcus* comptait 50 espèces, dont une vingtaine sont isolées chez l'homme. Le site internet *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (www.bacterio.net) de J.-P. Euzéby est régulièrement mis à jour pour l'ensemble des genres bactériens et peut être consulté pour une information sur la classification et la description des nouvelles espèces.

Habitat et pouvoir pathogène

Les staphylocoques sont pour la plupart des commensaux de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux, et sont potentiellement pathogènes à la faveur de la rupture de la barrière cutanéomuqueuse. *S. epidermidis* est l'espèce bactérienne la plus fréquemment isolée de la peau de l'homme sain. Il existe pour quelques espèces une niche écologique préférentielle ; par exemple, les plis cutanés et la muqueuse nasale pour *S. epidermidis*, ou le cuir chevelu de l'adulte pour *S. capitis*. *S. aureus* colonise préférentiellement la muqueuse nasale, où il est présent chez environ 30 % des individus en dehors de tout contact hospitalier. Le portage de *S. aureus* peut être intermittent ou persistant selon les individus.

Le pouvoir pathogène de *S. aureus* est lié à sa capacité de survie et à ses nombreux facteurs de virulence. Parmi eux, on retrouve des protéines de surface qui initient la colonisation des tissus de l'hôte, des facteurs inhibant la phagocytose, des toxines et enzymes qui lèsent les cellules et tissus. *S. aureus* est à l'origine de deux types de syndromes : les infections suppuratives et les toxi-infections.

Infections suppuratives

En tant que bactérie pyogène, *S. aureus* est responsable d'infections suppuratives impliquant une prolifération bactérienne, une invasion, une destruction des tissus de l'hôte et une réponse inflammatoire locale et systémique. On retrouve notamment :

- des infections de la peau et des tissus mous. Il s'agit le plus souvent d'auto-infections à partir de la flore endogène. Ces infections peuvent être bénignes (folliculite, furoncle, onyxis) ou sévères avec extension locorégionale (anthrax voire cellulite) ;
- des infections respiratoires. On différencie les pneumonies nécrosantes, souvent communautaires et dues à des souches productrices de la leucocidine de Panton-Valentine (PVL), des pneumopathies nosocomiales ;
- des septicémies, souvent à porte d'entrée cutanée et favorisées par la présence d'une lésion ou de matériel type cathéter ;
- de staphylococcies viscérales à partir de bactériémies, avec des localisations ostéoarticulaires (arthrite, ostéomyélite), cardiaques (endocardites), pleuropulmonaires ou urogénitales.

Les infections nosocomiales à *S. aureus* ne sont pas exceptionnelles : infections du site opératoire, ostéoarticulaires, pulmonaires, neurochirurgicales ou endophtalmiques.

Toxémies

Les toxémies staphylococciques, ou toxi-infections, sont associées à la production de toxines :

- la toxine du choc toxique staphylococcique (TSST-1), lors du syndrome de choc toxique, menstruel ou non. Le choc toxique associe fièvre, érythrodermie avec ou sans desquamation, hypotension, thrombopénie, et au moins trois atteintes viscérales (vomissements/diarrhées, myalgies, hyperhémie muqueuse, insuffisance rénale ou hépatique). La TSST-1 est également associée à la survenue du variant mineur du choc toxique : la scarlatine staphylococcique, pour laquelle seules l'érythrodermie, la thrombopénie et l'hyperhémie pharyngée sont retrouvées ;
- la leucocidine de Panton-Valentine (PVL) au cours des pneumonies nécrosantes ;
- les exfoliatines A et B lors du syndrome d'exfoliation généralisée (ou syndrome de la peau ébouillantée), correspondant à une érythrodermie suivie d'un décollement bulleux intra-épidermique. Cette pathologie est retrouvée notamment chez l'enfant, et chez l'adulte immunodéprimé ou insuffisant rénal. La forme mineure correspond à l'impétigo bulleux localisé. Les bulles formées sont le témoin de l'activité et de la diffusion toxinique mais ne contiennent pas la bactérie ;
- les entérotoxines responsables de toxi-infections alimentaires, 2 à 6 heures après ingestion de l'aliment contaminé.

Les staphylocoques à coagulase négative (SCN), longtemps considérés comme peu ou pas pathogènes, sont maintenant reconnus comme des bactéries pathogènes opportunistes, notamment les espèces *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. saprophyticus*. Les SCN peuvent être responsables de conjonctivites, d'endophtalmies, d'infections cutanées, d'infections urinaires (essentiellement *S. saprophyticus*), d'endocardites, de péritonites, d'infections osseuses et articulaires, de méningites postneurochirurgicales, d'infections sur matériel ou sur valves (endocardites et méningites), ainsi que de septicémies dont le point de départ peut être un cathéter.

Diagnostic direct en routine

Prélèvements et transport

Les staphylocoques sont suffisamment résistants à la dessiccation et au refroidissement pour qu'il n'y ait pas de conditions particulières de prélèvement et de transport. Les staphylocoques et notamment *S. aureus* peuvent cultiver à partir de n'importe quel prélèvement. Mais les bonnes procédures de prélèvements doivent être strictement appliquées, notamment en ce qui concerne l'asepsie. En effet, il faut tenir compte des risques de contamination des échantillons du fait de la présence, au niveau de la peau et des muqueuses, de flores hébergeant de nombreux staphylocoques.

Examen direct

Après coloration de Gram, les staphylocoques apparaissent comme des cocci à Gram positif de 0,8 à 1 µm de diamètre, isolés, ou en diplocoques, en courtes chaînettes ou plus classiquement en amas. L'aspect en tétrade ou grappe correspond à la disposition la plus caractéristique (du grec *staphylê*, grappe de raisin et *kokkos*, grain) (Fig. 28.1).

Culture

Les staphylocoques sont des bactéries peu exigeantes et peuvent être isolés en bouillon ou sur milieux solides simples tels que géloses ordinaires ou géloses au sang à 35–37 °C en aérobiose. Sur les milieux usuels, les colonies de staphylocoques, de taille variable (1 à 3 mm après 24 heures d'incubation) sont circulaires, opaques, légèrement bombées ou aplaties (Fig. 28.2). À noter que certaines espèces comme *S. saccharolyticus* ou *S. aureus* subsp. *anaerobius* cultivent plus lentement et préférentiellement en présence de CO_2. Les souches de type *small colony variants* (SCV), notamment associées aux infections chroniques, sont elles défectives pour certains gènes du métabolisme, et présentent une culture plus lente, sur milieux enrichis, avec une morphologie et des caractères phénotypiques atypiques. La pigmentation des colonies peut varier du blanc au jaune ou au jaune orangé. Sur gélose au sang, les souches « typiques » de *S. aureus* peuvent produire des colonies de couleur jaune doré, entourées d'une hémolyse β (voir Fig. 28.2). La plupart des espèces de SCN, dont certaines peuvent également présenter un halo d'hémolyse sur gélose au sang, ne peuvent être différenciées entre elles après une culture de 24 heures ; aussi est-il recommandé d'attendre une incubation de 2 à 3 jours pour distinguer les différentes colonies sur milieu gélosé.

Certains milieux de culture peuvent être utilisés soit dans un but sélectif, soit dans un but d'identification directe. On retrouve notamment :

- **les milieux gélosés sélectifs Columbia** additionnés d'antibiotiques **CNA** (colistine et acide nalidixique) ou



Fig. 28.2 Isolement sur gélose Columbia à 5 % de sang de mouton. A. *Micrococcus luteus*. **B.** *Staphylococcus aureus*. **C.** *Staphylococcus epidermidis*.

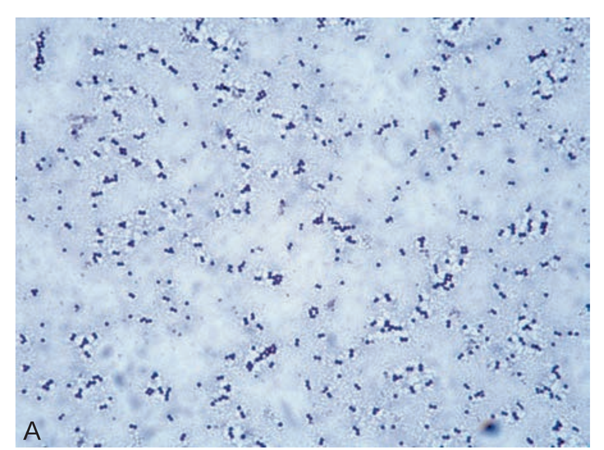




Fig. 28.1 A. Gram de *S. aureus*. B. Staphylocoques en microscopie à balayage.

CAP (colistine et aztréonam) qui permettent d'inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, et ainsi de sélectionner les bactéries à Gram positif dans un prélèvement polymicrobien;

- **le milieu sélectif de Chapman**, milieu gélosé hypersalé contenant du mannitol, destiné à identifier les colonies de *S. aureus* par présence d'un halo jaune; il doit désormais être considéré comme historique du fait de son manque de spécificité et du retard de croissance;
- **les milieux chromogènes** : fondés sur la dégradation d'un substrat en métabolite coloré spécifique d'espèce, différents milieux chromogènes proposent l'identification directe de *S. aureus* (plus ou moins associé à la détection de la résistance à la méticilline) en fonction de la couleur des colonies obtenues (Fig. 28.3). Sont actuellement commercialisés en France :
  - Brilliance Staph 24® (Oxoid);
  - ChromID® *S. aureus* (SAID) (bioMérieux);
  - CHROMagar® *Staph aureus* (CHROMagar);
  - BBL CHROMagar® *Staph aureus* (BD Diagnostics).

Ces milieux commerciaux présentent d'excellentes performances en termes de sensibilité et spécificité, de l'ordre de 97 à 99 % pour l'identification de *S. aureus*. Parallèlement à l'identification directe des *S. aureus*, différents fabricants proposent des milieux permettant la détection des *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM) pour le dépistage des patients porteurs, en rajoutant un antibiotique sélectionnant les souches résistantes à la méticilline :

- ChromID® *S. aureus*/ChromID® SARM bi-plate (bioMérieux);
- ChromID® SARM (bioMérieux);
- CHROMagar® MRSA (CHROMagar);
- BBL CHROMagar® MRSA (BD Diagnostics).

Pour la recherche de SARM, tous les milieux présentent une excellente spécificité à 24 heures. Ils se différencient par leur sensibilité à 24 heures (88 à 95 %) et leur capacité à conserver une bonne spécificité à 48 heures (92 à 99 %) si la sensibilité à 24 heures est insuffisante. À noter que ces milieux chromogènes sont souvent validés uniquement pour la recherche de portage nasal mais des études ont montré leur intérêt sur d'autres prélèvements.

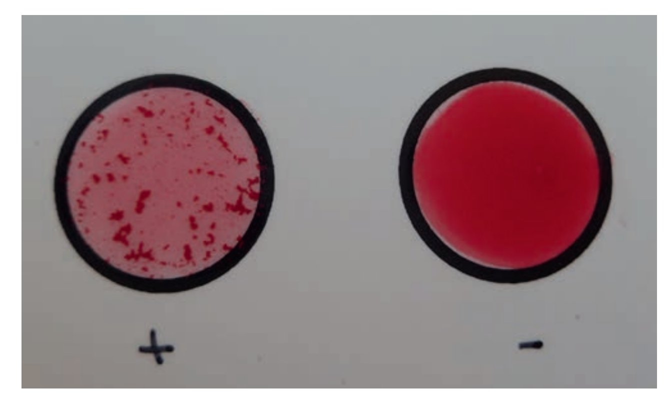


Fig. 28.3 Culture sur milieu chromogène. *S. aureus* (à gauche) *et* SCN (à droite). La couleur des colonies de *S. aureus* varie selon les fabricants.

Identification de genre

La détection de la **catalase** permet de différencier, parmi les cocci à Gram positif, les staphylocoques des streptocoques. Après introduction de colonies dans un tube contenant du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 3 %, la formation immédiate de bulles d'oxygène témoigne de la présence d'une catalase. Une fausse réaction positive peut survenir lorsque la colonie à tester est prélevée sur gélose au sang en raison de l'activité catalasique érythrocytaire. La catalase est un caractère constant chez les staphylocoques, malgré quelques rares cas rapportés de *S. aureus* à catalase négative.

Identification de l'espèce

L'espèce *S. aureus*, considérée le plus fréquemment comme pathogène pour l'homme, doit être identifiée et différenciée des SCN et tout particulièrement des espèces les plus retrouvées en pathologie humaine, à savoir *S. epidermidis, S. haemolyticus* ou encore *S. saprophyticus* (Tableau 28.2). En pratique, différents tests peuvent être utilisés pour le diagnostic différentiel entre *S. aureus* et les autres espèces.

Les **tests rapides d'orientation** sont les suivants.

- Recherche de la **coagulase libre :** la coagulase libre est présente chez *S. aureus*, mais peut aussi être produite par *S. intermedius, S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus* et *S. pseudointermedius*. Ce test consiste à mettre en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma. Dans un tube à hémolyse, on mélange 0,5 ml de plasma de lapin (reconstitué à partir d'un lyophilisat commercialisé par différents laboratoires) et 0,5 ml d'une culture de 18 heures en bouillon ou 0,5 ml d'une suspension dense de la bactérie à étudier. Le mélange est placé à l'étuve à 37 °C et est incubé pendant 24 heures. Les souches de *S. aureus* provoquent la coagulation du plasma, le plus souvent lors des trois premières heures. La prise en masse est généralement totale (Fig. 28.4) mais parfois légère et plus tardive, et la réaction doit être considérée comme positive si le phénomène intervient avant la 24e heure. La formation d'un précipité fibreux ou floculeux doit être considérée comme un résultat négatif. Le mélange est observé d'heure en heure car le coagulum peut être suivi d'une redissolution du caillot provoquée par la fibrinolyse.
- Recherche du **facteur d'affinité pour le fibrinogène** (coagulase liée ou *clumping factor*) : il est présent chez *S. aureus*, mais peut aussi être retrouvé chez *S. lugdunensis, S. intermedius* et *S. schleiferi*. Ce test consiste en la mise en évidence du facteur d'affinité pour le fibrinogène présent à la surface de *S. aureus*. Les suspensions de *S. aureus* réagissent avec des constituants du plasma humain dilué au 1/5e en entraînant une agglutination rapide.
- Recherche de la **protéine A :** cette protéine A peut être retrouvée chez *S. aureus*, mais aussi chez les souches de *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, la plupart des souches de *S. hyicus* et de rares souches de *S. intermedius*. La protéine A est associée au peptidoglycane de *S. aureus* et a la propriété de fixer le fragment Fc des immunoglobulines (Ig) (Fig. 28.5) de l'homme et du lapin. Ce test consiste à rechercher l'agglutination sur lame des staphylocoques mis en présence d'hématies de mouton sensibilisées par du sérum de lapin anti-hématies de mouton ou de parti-

Tableau 28.2 **Caractères biochimiques distinctifs des principales espèces de *Staphylococcus* isolées chez l'homme.**

	S. aureus	*S. epidermidis*	*S. haemolyticus*	*S. saprophyticus*	Autres staphylocoques
Coagulase	+	–	–	–	–
Clumping factor	+	–	–	–	–
Fermentation					
Glucose Mannitol Xylitol	+ + –	+ – –	+ V –	+ + +	+ V –
Phosphatase	+	+	–	–	V
Dnase	+	–	–	–	V
Novobiocine (5 µg)*	S	S	S	R	V

V : variable ; + : 90 % ou plus de souches positives ; – : 90 % ou plus de souches négatives.
* Le disque est déposé sur un milieu Mueller-Hinton ensemencé comme un antibiogramme, S pour sensible si le diamètre ≥ 16 mm et R pour résistant si le diamètre < 16 mm.

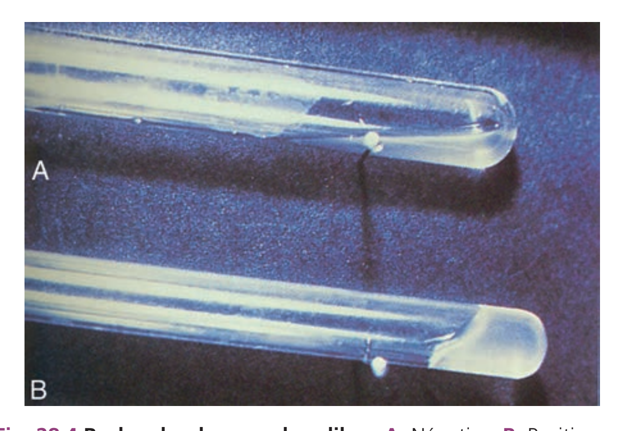


Fig. 28.4 Recherche de coagulase libre. A. Négative. **B.** Positive.

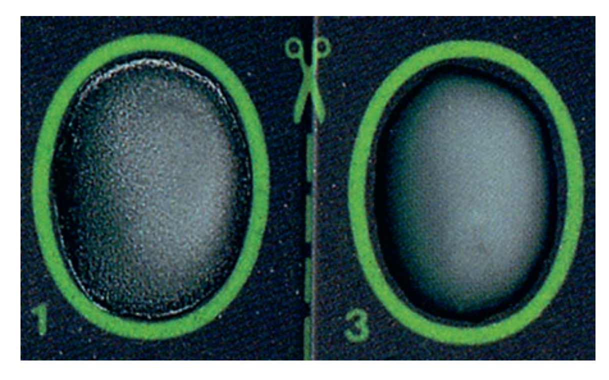


Fig. 28.6 Test rapide d'agglutination pour la caractérisation de *S. aureus* : 1. test positif, 3. test négatif.

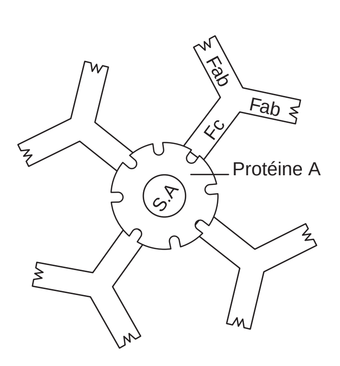


Fig. 28.5 Représentation schématique de la fixation de la protéine A à la fraction Fc des immunoglobulines. S.A : *Staphylococcus aureus ;* Fc : fraction Fc des immunoglobulines ; A : protéine A, constitutive de la paroi de *S. aureus*.

cules de latex recouvertes d'IgG. Malheureusement, cette recherche peut rester négative, car la synthèse peut être inhibée par le milieu de culture et certaines souches ne sont pas productrices de protéine A.

- **Recherche combinée des différents facteurs.** Devant la sensibilité limitée de chacun de ces tests d'orientation et afin d'améliorer leur praticabilité, différents fabricants ont mis au point des tests d'agglutination permettant une identification présomptive de *S. aureus* par la recherche simultanée du facteur d'affinité pour le fibrinogène, de la protéine A et ± de polysaccharides capsulaires de *S. aureus* (Fig. 28.6). Ces réactifs sont constitués de billes de latex ou d'hématies sensibilisées avec du fibrinogène, des IgG et des anticorps monoclonaux spécifiques de **polysaccharides capsulaires** de *S. aureus*, généralement ceux de types 5 et 8 (Tableau 28.3). Quelques colonies de staphylocoques (éviter de prélever les colonies sur milieu de Chapman, sur gélose ANC ou sur gélose CAP) sont mises en suspension dans une goutte de billes de latex ou d'hématies sensibilisées. Si une agglutination franche apparaît presque instantanément, la réaction est dite positive. Les performances des trousses permettant cette double ou triple réaction ont été évaluées dans le diagnostic de l'espèce *S. aureus* et ont montré des valeurs de sensibilité de 88,9 à 100 % et de spécificité de 91 à 99 %.

Parmi ces tests, si deux sont trouvés positifs, on peut considérer que l'identification de *S. aureus* est validée, mais toute discordance entre les deux tests utilisés nécessite une identification complète. De plus en plus, l'identification en routine de *S. aureus* repose sur l'association d'un test d'orientation rapide et d'une identification complète.

Tableau 28.3 **Tests d'agglutinations commercialisés permettant l'identification de *Staphylococcus aureus*.**

	Fabricant-distributeur	Support	Recherche
Slidex Staph Plus®	bioMérieux	Latex	*Clumping factor* Protéine A Polysaccharides capsulaires
BBL^{T} Staphyloslide®	BD Diagnostics	Latex	*Clumping factor* Protéine A
Pastorex Staph Plus®	Bio-Rad	Latex	*Clumping factor* Protéine A Polysaccharides capsulaires
Staphytect Plus®	Thermo Scientific	Latex	*Clumping factor* Protéine A Polysaccharides capsulaires
Staph aureus Fumouze®	Fumouze	Hématies	*Clumping factor* Protéine A
Prolex® STAPH	I2a	Latex	*Clumping factor* Protéine A
Prolex® STAPH XTRA	I2a	Latex	*Clumping factor* Protéine A Polysaccharides capsulaires
Staphaurex®	Thermo Scientific	Latex	*Clumping factor* Protéine A
Staphaurex® Plus	Thermo Scientific	Latex	*Clumping factor* Protéine A Antigènes de surface
BactiStaph®	Thermo Scientific	Latex	*Clumping factor* Protéine A
Phadebact® Staph aureus test	MKL Diagnostics	Latex	*Clumping factor* Protéine A
Staph Plus Kit®	Diamondial	Latex	*Clumping factor* Protéine A Polysaccharides capsulaires
ELITex Staph®	ELITechGroup	Latex	*Clumping factor* Protéine A Polysaccharides capsulaires

Pour l'**identification complète**, deux grandes méthodes sont désormais utilisées : la galerie biochimique d'identification, et le *matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight* (MALDI-TOF).

- **Galeries d'identification biochimiques.** Ces galeries reposent sur des tests enzymatiques (zymogrammes), des tests d'acidification ou d'utilisation des sucres (auxanogrammes) ainsi que des tests de résistance à des substances inhibitrices (Tableaux 28.2 et 28.4). Les différents systèmes, manuels ou automatisés, utilisés en France sont :
  - API Staph®, ID 32 Staph® et RAPIDEC Staph® (bioMérieux) ;
  - système Vitek 2® avec les cartes Vitek 2 GP® (bioMérieux) ;
  - système BBL Crystal® Gram-Positive (BD Diagnostics) ;
  - système BD Phoenix® avec les galeries PID® et PMIC/ID-104® (BD Diagnostics).

  Ces systèmes permettent une identification après 18 à 24 heures d'incubation. Afin d'obtenir un résultat fiable et reproductible, un respect des protocoles délivrés par les fournisseurs est fortement recommandé, notamment en ce qui concerne les inoculums, les temps et températures d'incubation, ainsi que les temps de réactions lors d'ajout des réactifs de révélation. Pour une même souche, des modifications de profils pourront être observées suivant le nombre de subcultures et les milieux utilisés pour celles-ci. En effet, des enzymes pourront être induites ou réprimées par certains constituants des différents milieux.
- **MALDI-TOF.** Cette technique repose sur l'identification de la bactérie par comparaison du spectre de masse protéique obtenu à ceux de la base de données du fournisseur. À l'heure actuelle, plusieurs systèmes sont commercialisés :
  - les automates : Microflex (Bruker®) et Axima (Shimadzu®) ;
  - les bases de données : IVD® ou SARAMIS® (bioMérieux), Andromas® (Andromas), Biotyper® (Bruker).

  Les systèmes commercialisés correspondent à la combinaison d'un instrument et d'une base de données : système Vitek®MS (instrument Axima et bases IVD® ou SARAMIS®), système Biotyper® (instrument Microflex et base Biotyper®), système Andromas® (instrument Microflex et base Andromas®).

  Les SCN ne sont pris en compte et identifiés que lorsque les circonstances de leur isolement indiquent qu'ils sont potentiellement pathogènes : souches identiques isolées simultanément ou à plusieurs jours d'intervalle à partir du même site, de plusieurs sites différents, d'hémocultures ou d'autres liquides biologiques normalement stériles.

Diagnostic moléculaire

L'identification par technique de biologie moléculaire des staphylocoques, plus ou moins associée à la détection de la résistance à la méticilline, est désormais largement répandue. Ces techniques sont applicables directement à partir des **prélèvements**, qu'ils soient **mono- ou polymicrobiens**, **d'hémocultures positives,** ou de **culture pure**. L'amplification peut être réalisée par PCR point final ou par PCR en temps réel. La cible amplifiée dépendra de la spécificité souhaitée. On trouve ainsi des cibles permettant les identifications suivantes.

Spécifique d'espèce de *S. aureus*

Les cibles couramment choisies dans ce cas sont le gène *nuc* codant la nucléase, ou *femA* impliqué dans le métabolisme du peptidoglycane. Elles permettent la détection de *S. aureus* à partir d'un prélèvement polymicrobien. De nombreux kits commerciaux sont disponibles sur le marché.

Tableau 28.4 **Principaux caractères discriminants permettant le diagnostic d'espèce de *S. aureus* et des staphylocoques à coagulase négative le plus souvent isolés chez l'homme.**

	Pigment	Uréase	Ornithine décarboxylase	Phosphatase alcaline	Pyrrolydonyl arylamidase	Arginine arylamidase	β-glucuronidase	β-galactosidase	Production d'acétoïne	Réduction des nitrates	Hydrolyse de l'esculine	N-acétylglucosamine	L-arabinose	D-cellobiose	α-lactose	Maltose	Mannitol	D-mannose	Raffinose	Saccharose	D-turanose	D-tréalose	D-xylose
S. aureus	+	V	–	+	–	–	–	–	+	+	–	+	–	–	+	+	+	+	–	+	+	+	–
S. auricularis	–	–	–	–	V	+	–	–	V	V	–	–	–	–	–	+	–	–	–	V	V	+	–
S. capitis	–	–	–	–	–	–	–	–	V	V	–	–	–	–	–	V	+	+	–	+	–	–	–
S. cohnii	–	–	–	–	–	–	–	–	V	–	–	–	–	–	–	V	V	V	–	–	–	+	–
S. epidermidis	–	+	V	V	–	–	–	–	+	V	–	–	–	–	V	+	–	+	–	+	V	–	–
S. haemolyticus	V	–	–	–	+	–	V	–	+	V	–	+	–	–	V	+	V	–	–	+	V	+	–
S. hominis	V	+	–	–	–	–	–	–	+	+	–	V	–	–	V	+	–	–	–	+	+	V	–
S. lugdunensis	V	V	+	–	+	–	–	–	+	+	–	V	–	–	+	+	–	+	–	+	V	+	–
S. saprophyticus	V	–	–	–	V	–	–	+	+	–	–	V	–	–	V	+	V	–	–	+	+	+	–
S. schleiferi	–	–	–	+	+	–	–	V	+	V	–	V	–	–	–	–	–	+	–	–	–	V	–
S. simulans	–	+	–	V	+	–	V	+	V	+	–	+	–	–	+	+	+	V	–	+	–	V	–
S. warneri	V	+	–	–	–	–	V	–	+	V	–	V	–	–	V	+	V	–	–	+	V	+	–

+ : 90 % ou plus de souches positives ; – : 90 % ou plus de souches négatives ; V (variable) : 11 à 89 % de souches positives.

Spécifique du genre *Staphylococcus*

Par exemple, la PCR-séquençage du gène *tuf*, codant un facteur d'élongation, permet l'identification de *S. aureus* et des staphylocoques à coagulase négative. Cela implique néanmoins que le prélèvement ne contienne qu'une seule espèce de staphylocoque.

Non spécifiques

La PCR universelle permet par exemple l'identification d'autres genres bactériens. Les gènes 16S rDNA, codant l'ARN 16S, *rpo*B, codant l'ARN polymérase, ou *sod*, codant la superoxyde dismutase, constituent des cibles courantes. Du fait du manque de spécificité, cette technique nécessite que le prélèvement de départ soit monomicrobien (issu d'un site stérile), ou d'être réalisée à partir d'un isolement pur.

Résistance aux antibiotiques des staphylocoques

Antibiogramme standard

Selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST 2016, l'étude de la sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion s'effectue sur gélose Mueller-Hinton en atmosphère aérobie. À partir d'une culture de 18 à 24 heures sur milieu gélosé approprié, une suspension à 0,5 MacFarland en solution saline est préparée. La suspension est ensemencée par écouvillonnage sur gélose Mueller-Hinton puis, après séchage à l'étuve, les disques sont déposés sur la gélose. La lecture doit être réalisée en respectant les règles édictées par le CA-SFM/EUCAST. L'antibiogramme peut également être réalisé par la méthode de dilution en milieu liquide (méthode de référence) ou grâce à des galeries automatisées.

Pour les glycopeptides, l'antibiogramme par la méthode des disques n'est pas fiable et doit reposer sur une méthode permettant la mesure des CMI. Pour *S. aureus*, des tests complémentaires doivent être pratiqués avant une interprétation définitive afin de détecter les souches de sensibilité diminuée à ces antibiotiques.

β-lactamines

Recherche d'une pénicillinase

Aujourd'hui, près de 87 % des souches de staphylocoques résistent à la pénicilline G par production de pénicillinases extracellulaires, inductibles et codées par des plasmides. Elles inactivent les pénicillines G et V, les aminopénicillines, les carboxypénicillines et les uréidopénicillines. En revanche, elles ont peu d'affinité pour la méticilline, l'oxacilline, la cloxacilline, les céphalosporines, les carbapénèmes, et elles sont inhibées par l'acide clavulanique. La production de pénicillinase est détectée sur l'antibiogramme standard en observant le diamètre autour d'un disque de pénicilline G. Toute souche dont le diamètre est strictement inférieur à 26 mm est considérée comme productrice de pénicillinase. Lorsque le diamètre est supérieur ou égal à 26 mm, un aspect net de la bordure de la zone d'inhibition signe une production de pénicillinase. Au contraire, l'absence de pénicillinase se traduit par un aspect flou de la bordure. La présence de pénicillinase peut aussi être confirmée par un test chromogénique. Après avoir prélevé les colonies autour du disque d'oxacilline, de céfoxitine ou de moxalactam afin d'induire l'expression de l'enzyme, on les dispose sur un disque de Céfinase® préalablement humidifié que l'on incube à 37 °C, et si une coloration brune apparaît dans un délai d'une heure, une pénicillinase est bien présente.

Résistance à la méticilline chez *S. aureus*

Aujourd'hui, environ 20 % des souches hospitalières de *S. aureus* sont résistantes à la méticilline (SARM). Les SARM hébergent généralement le gène *mec*A qui code pour une PLP2a additionnelle, protéine de liaison à la pénicilline de faible affinité, responsable de la résistance intrinsèque à toutes les β-lactamines, ainsi qu'aux inhibiteurs des β-lactamases, à l'exception de nouvelles céphalosporines actives sur les SARM récemment mises sur le marché (ceftaroline, ceftobiprole). Un variant de *mec*A, nommé *mec*C, a été décrit en 2011 chez *S. aureus* et est également responsable de résistance à la méticilline (PLP2c additionnelle). L'expression phénotypique de la résistance à la méticilline peut être homogène (l'ensemble de la population apparaît résistante) ou hétérogène (une fraction plus ou moins importante de la population apparaît résistante). Par la méthode de diffusion, la recherche de la méticillinorésistance s'effectue à l'aide d'un disque de céfoxitine (30 μg) dans les conditions standard de l'antibiogramme. Les souches de *S. aureus* présentant un diamètre supérieur ou égal à 25 mm sont sensibles ; celles ayant un diamètre strictement inférieur à 22 mm sont résistantes. Entre les deux bornes, il est nécessaire de rechercher la présence des gènes *mec*A/*mec*C par PCR ou l'expression d'une PLP additionnelle (PLP2a, PLP2c) après induction par une β-lactamine.

Des **tests immunologiques utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la PLP2a** ont été développés pour détecter la résistance à la méticilline directement à partir de culture primaire de *S. aureus*, permettant de raccourcir le délai de réponse de 24 heures par rapport à l'antibiogramme classique. La PLP2a peut être recherchée par des techniques d'agglutinations avec des particules de latex sensibilisées (PBP2' test® d'Oxoid par exemple) ou par test immunochromatographique, plus sensible et plus spécifique (PBP2a Culture Colony Test® d'Alere). Il consiste à extraire quelques colonies de staphylocoques dans un tube à l'aide de deux réactifs, et ensuite à déposer une bandelette sur laquelle se trouvent un anticorps monoclonal anti-PLP2a et un anticorps de contrôle. Le résultat est obtenu après 5 minutes de migration. Pour les staphylocoques à coagulase négative, ces tests doivent être réalisés après induction par l'oxacilline ou la céfoxitine pour avoir une bonne sensibilité.

Les systèmes automatisés peuvent manquer de fiabilité dans la détection d'une résistance hétérogène. En cas de doute, la confirmation se fera là aussi par PCR *mec*A/*mec*C ou par recherche de PLP additionnelle. La résistance liée au gène *mec*C peut également poser des problèmes de détection phénotypique : la céfoxitine s'est révélée être un meilleur marqueur que l'oxacilline pour ces souches, ces souches présentant des CMI plus basses pour l'oxacilline. Les SARM possédant le gène *mecC* présentent généralement une résistance isolée à la méticilline.

Il est à noter que deux autres mécanismes peuvent être à l'origine d'une sensibilité diminuée de souches de *S. aureus*

à l'oxacilline mais ils restent marginaux. Ces deux mécanismes sont l'hyperproduction constitutive de la pénicillinase plasmidique (souches dites BORSA, pour *borderline oxacillin-resistant S. aureus*) et la modification de l'affinité ou l'expression des PLP naturelles de *S. aureus* (souches dites MODSA, pour *modified PBP S. aureus*).

Glycopeptides

Depuis les années 1980, des souches de staphylocoques à coagulase négative de sensibilité diminuée aux glycopeptides ont été décrites. Au cours des années 1990, ont également été rapportées les premières souches de *S. aureus* de sensibilité diminuée. Pour *S. aureus*, les phénotypes de résistance suivants sont décrits :

- résistance homogène (GISA, *glycopeptide-intermediate S. aureus*), pour laquelle les CMI de la vancomycine et de la teicoplanine sont strictement supérieures à 2 mg/l ;
- résistance hétérogène (hGISA, *heterogeneous* GISA) pour laquelle les CMI de la vancomycine et de la teicoplanine sont inférieures ou égales à 2 mg/l alors que la souche héberge une sous-population résistante, capable de croître en présence de vancomycine à des concentrations supérieures à 2 mg/l.

Cette diminution de sensibilité aux glycopeptides est liée à une anomalie de synthèse du peptidoglycane avec épaississement de la paroi, responsable d'un défaut de pénétration et de fixation des glycopeptides au niveau de leur site d'action. Ces anomalies sont dues à une accumulation de mutations et non à l'acquisition de matériel génétique.

Selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST 2016, la sensibilité diminuée aux glycopeptides ne doit plus être recherchée par la méthode des disques mais par une méthode permettant de déterminer la CMI. La méthode de référence est la microdilution, mais en l'absence de réactifs commercialisés pour la réaliser, les bandelettes en gradient de diffusion ou une méthode automatisée de dilution en milieu liquide peuvent s'y substituer.

Il est à noter que la résistance hétérogène est difficile à détecter quelle que soit la méthode utilisée. Elle doit être recherchée sur les souches de *S. aureus* lorsque la CMI mesurée est > 1 mg/l pour la teicoplanine et/ou la vancomycine. Dès lors, différentes méthodes de *screening* ont été décrites dans la littérature, et le CA-SFM/EUCAST 2016 recommande deux techniques :

- soit le test Teico 5 : ensemencement de 10 µl, en spot, d'une suspension à 2 MacFarland sur une gélose MH additionnée de 5 mg/l de teicoplanine et incubée à 35 ± 2 °C. Après lecture à 24 et à 48 heures, la présence d'au moins quatre colonies par spot fait suspecter une souche de sensibilité diminuée aux glycopeptides. Certains laboratoires ont développé des géloses contenant de la teicoplanine comme recommandé par le CA-SFM, la gélose Mueller-Hinton GISA® d'i2a par exemple ;
- soit le test des macrobandelettes : ensemencement d'une gélose cœur-cervelle par écouvillonnage à l'aide d'une suspension à 2 MacFarland et dépôt de deux bandelettes de vancomycine et de teicoplanine. Après 48 heures d'incubation à 35 ± 2 °C, si les valeurs pour la vancomycine et la teicoplanine sont toutes deux supérieures ou égales à 8 mg/l ou la valeur pour la teicoplanine seule est supérieure ou égale à 12 mg/l, alors la souche est suspectée d'être de sensibilité diminuée aux glycopeptides.

Si ce *screening* est positif, il convient de ne pas rendre les CMI des glycopeptides en raison de l'existence probable d'une sous-population résistante. Pour conclure définitivement, un dépistage positif devra faire l'objet d'une confirmation dans un centre expert par la méthode d'analyse de population qui constitue la méthode de référence. En effet, différentes études ont montré que seules les analyses de population, décrites par Hiramatsu en 1997, sont fiables, mais malheureusement elles demandent à la fois du personnel formé et du temps pour leur réalisation, les rendant ainsi difficilement utilisables dans les laboratoires de routine.

Il est à noter que, outre le mécanisme de sensibilité diminuée aux glycopeptides liée à un épaississement de la paroi bactérienne, un second mécanisme a été décrit comme conférant la résistance aux glycopeptides chez *S. aureus*, cette fois-ci à haut niveau. En effet, **des souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine (VRSA) avec des CMI à la vancomycine et à la teicoplanine > 16 mg/l ont été rapportées**, majoritairement aux États-Unis. Ces souches possédaient l'opéron *vanA*, responsable de la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques, mais ce phénomène reste rarissime (seulement 13 souches décrites dans le monde).

Aminosides

La résistance des staphylocoques aux aminosides est principalement liée à l'acquisition via des transposons ou des plasmides d'enzymes inactivant ces antibiotiques. Trois phénotypes de résistance majeurs peuvent être retrouvés : résistance à l'amikacine et la kanamycine (phénotype « K » lié à une aminoside 3′-phosphotransférase), résistance à l'amikacine, la kanamycine et la tobramycine (phénotype « KT » lié à une aminoside adényltransférase) et résistance à l'amikacine, la kanamycine, la tobramycine et la gentamicine (phénotype « KTG », lié à une enzyme bifonctionnelle aminoside 6′-acétyltransférase et aminoside 2″-phosphotransférase).

Macrolides, lincosamides, streptogramines (MLS)

La résistance des staphylocoques aux MLS peut reposer sur la modification de la cible (ARN ribosomal 23S), l'inactivation de l'antibiotique ou un mécanisme d'efflux. Le mécanisme le plus fréquent est l'acquisition d'une méthylase modifiant le site d'action des MLS au niveau du ribosome. Ce phénotype, appelé MLSb, peut être inductible (résistance aux macrolides en C14) ou constitutif (résistance aux macrolides en C14, C16, lincosamides, streptogramines B).

Fluoroquinolones

La résistance du staphylocoque aux fluoroquinolones est croisée entre toutes les molécules de cette famille, à part la moxifloxacine qui peut rester active sur une souche résistante aux autres fluoroquinolones. Le mécanisme de résistance repose le plus souvent sur une modification de la cible (topo-isomérases II et IV) et parfois sur un phénomène d'efflux.

Autres antibiotiques

Les staphylocoques peuvent être résistants à la tétracycline par mécanisme d'efflux le plus souvent (dans ce cas, la minocyline reste active). Les résistances à la rifampicine sont liées à des mutations du gène *rpoB* responsables d'une modification de sa cible (ARN-polymérase). Les staphylocoques sont généralement sensibles au linézolide, à la tigécycline et à la daptomycine, mais il est nécessaire de surveiller et d'étudier l'émergence de résistances à ces antibiotiques.

Analyses spécialisées

Analyses toxiniques

Le Centre national de référence (CNR) des staphylocoques propose l'analyse du profil toxinique des souches de *S. aureus* par puce à ADN, ciblant des gènes de contrôle d'espèce, des gènes régulateurs (*agr*), de résistance aux antibiotiques et de nombreux facteurs de virulence (adhésines, exoprotéines, toxines, etc.) de *S. aureus*. Pour cette caractérisation, le CNR utilise des puces à ADN ciblant 185 gènes et environ 300 allèles, mais aussi de plus en plus le séquençage de génome entier.

Dans le cadre de toxi-infection alimentaire collective (TIAC), la production des entérotoxines A à E pourra être détectée au CNR par technique ELISA. Cette recherche s'effectue uniquement à partir de prélèvements de vomissements, conservés à +4 °C pour préserver les protéines. La recherche de *S. aureus* et d'entérotoxines dans les selles n'est pas réalisée car elle ne présente pas d'intérêt microbiologique, 30 % environ des souches de *S. aureus* produisant des entérotoxines en dehors de toute TIAC. De même, seuls les laboratoires vétérinaires sont habilités à rechercher les toxines à partir des aliments suspects. En cas de suspicion de TIAC à *S. aureus*, il est donc recommandé de contacter rapidement le CNR pour organiser l'analyse.

Marqueurs épidémiologiques

Des souches de staphylocoques peuvent nécessiter d'être comparées entre elles dans un contexte d'infections nosocomiales ou d'épidémies en collectivité, afin de déterminer les liens entre les isolats et l'origine de la contamination.

En épidémiologie, une méthode n'est utilisable que si elle est reproductible, si elle permet de typer le plus grand nombre de souches et si elle permet de distinguer deux souches non reliées épidémiologiquement. Les systèmes de typage peuvent être classés en deux grandes catégories, les techniques phénotypiques (qui détectent des caractères exprimés par les micro-organismes) et les techniques génotypiques (qui s'appuient uniquement sur des caractères de l'ADN chromosomique ou extrachromosomique).

Les techniques phénotypiques ne sont plus utilisées du fait du manque de pouvoir discriminant et de reproductibilité. Actuellement, la comparaison des souches de staphylocoques repose sur les techniques génotypiques :

- l'**électrophorèse en champ pulsé** (*pulsed-field gel electrophoresis* [PFGE]) consiste à digérer l'ADN total des souches à l'aide d'enzymes de restriction possédant un faible nombre de sites de coupures. De grands fragments sont ainsi obtenus et séparés par une électrophorèse en gel d'agarose en champ variable. La PFGE s'est révélée être une des méthodes les plus discriminantes, permettant d'investiguer les épidémies au niveau local;
- le ***spa-typing*** consiste à analyser le polymorphisme de la région hypervariable X du gène *spa* codant pour la protéine A spécifique de *S. aureus*. Cette méthode de typage présente l'avantage d'être rapide et reproductible et d'être utilisable dans des études épidémiologiques à la fois locales et globales;
- le ***multilocus sequence typing*** (MLST) repose sur l'analyse de la séquence de gènes de ménage. Pour *S. aureus*, l'analyse d'une séquence interne d'environ 500 pb de 7 gènes sélectionnés (gènes codant la carbamate kinase [*arc*], la shikimate déshydrogénase [*aro*], la glycérol kinase [*glp*], la guanylate kinase [*gmk*], la phosphatase acétyltransférase [*pta*], la triosephosphate isomérase [*tpi*] et l'acétyle coenzyme A acétyltransférase [*yqi*]) a été adoptée par consensus par les utilisateurs. Toute mutation relevée dans la séquence d'un de ces gènes définit un nouvel allèle. La combinaison des allèles des différents gènes analysés permet de définir un *sequence type*, ST (http://saureus.mlst.net). Le MLST est une technique discriminante et reproductible d'un laboratoire à l'autre, permettant son utilisation en macro-épidémiologie. Malheureusement, elle est très lourde pour un laboratoire de routine et, de ce fait, elle est réalisée seulement dans des laboratoires spécialisés, notamment au CNR des staphylocoques à Lyon;
- le séquençage de génome entier : cette approche est amenée à devenir le standard en épidémiologie moléculaire compte tenu de son caractère universel, reproductible, portable et de la puissance de la discrimination. Différentes méthodes d'analyse du génome sont utilisées, incluant ou pas un assemblage et se référant ou pas à des listes de gènes utilisés comme marqueurs sur un principe un peu similaire au MLST. Le caractère relativement clonal de *S. aureus* et une horloge moléculaire rapide ($1,3 – 3,8 \times 10^{-6}$ par site et par an) confèrent à ces données génomiques un grand pouvoir contributif aussi bien à l'investigation d'épidémies à l'échelle d'un service ou d'un hôpital qu'aux analyses phylogénétiques et phylogéographiques destinées à décrire l'origine et l'évolution des grands clones.

Diagnostic sérologique des infections staphylococciques

Le diagnostic sérologique présente un intérêt faible au cours des infections staphylococciques et ne présente pas d'indication en routine. La majorité de la population adulte possède des anticorps dirigés contre divers antigènes de *S. aureus* (sans pour autant être nécessairement protégée d'une infection à staphylocoque). Les seules sérologies pouvant présenter un intérêt clinique sont les sérologies spécifiques anti-TSST1 et anti-PVL. La sérologie TSST-1 peut aider au diagnostic rétrospectif de choc toxique staphylococcique et permettre d'identifier les sujets ayant fait une séroconversion afin de proposer une prévention aux patientes restées séronégatives. En effet, dans le cas du choc toxique menstruel, une patiente restant séronégative à distance de l'épisode présente un risque accru de récidive, d'où la nécessité de déconseiller l'utilisation de tampons périodiques en l'absence de séroconversion. La sérologie PVL pourrait elle aussi aider au diagnostic rétrospectif des infections liées à cette toxine.

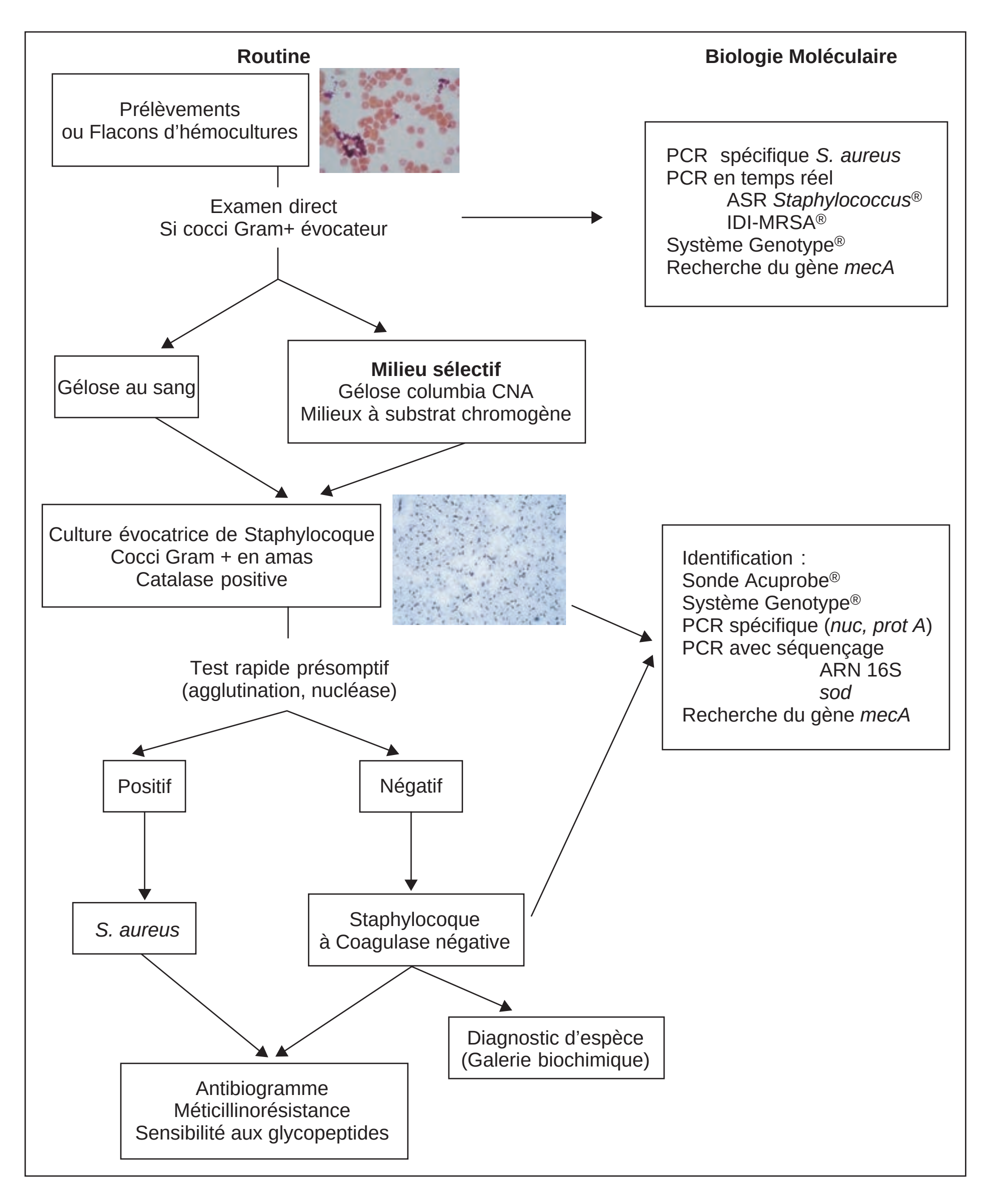


Fig. 28.7 Démarche diagnostique d'une infection à staphylocoque.

Néanmoins, le diagnostic des infections staphylococciques repose avant tout sur le diagnostic direct.

Au total, le diagnostic d'une infection à staphylocoque n'est pas trivial, mais on peut résumer la démarche diagnostique de manière schématique (Fig. 28.7). Certaines souches de *S. aureus* sont atypiques (SCV). Les staphylocoques à coagulase négative ont un pouvoir pathogène accru sur des terrains fragilisés mais sont fréquemment isolés comme contaminants, ce qui rend leur interprétation parfois complexe. De plus, l'étude de la sensibilité aux antibiotiques nécessite, en plus des techniques standard, des approches spécifiques pour les β-lactamines et les glycopeptides notamment.

Pour en savoir plus

Bannerman TL, Peacock SJ. Staphylococcus Micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In : Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al., editors. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC ASM Press ; 2007. p. 390–411.

Brun Y, Bes M, Vandenesch F. Staphylococcus. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. 2e éd. Paris : ESKA ; 2007. p. 795–844.

Chesneau O, Allignet J, El Sohl N. Thermonuclease gene as a target nucleotide sequence for specific recognition of Staphylococcus aureus. Mol Cell Probes 1993 ; 7 : 301–10.

Corso A, Soloaga R, Faccone D, et al. Improvement of a latex agglutination test for the evaluation of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. Diagn Microbiol Infect Dis 2004 ; 50 : 223–5.

Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. Antibiogramme. 3e éd. Paris : ESKA ; 2012.

Drancourt M, Raoult D. rpoB gene sequence-based identification of Staphylococcus species. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 1333–8.

García-Álvarez L, Holden MTG, Lindsay H, et al. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark : a descriptive study. Lancet Infect Dis 2011 ; 11 : 595–603.

Gauduchon V, Chalabreysse L, Étienne J, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 763–6.
Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 1997 ; 350 : 1670–3.
Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, et al. Relationships between Staphylococcus aureus genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infect Immun 2002 ; 77 : 631–41.
Monecke S, Slickers P, Ehricht R. Assignment of Staphylococcus aureus isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition. FEMS Immunol Med Microbiol 2008 ; 53 : 237–51.
Murakami K, Minamide W, Wada K, et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991 ; 29 : 2240–1.
Périchon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother 2009 ; 53 : 4580–7.
Ploy MC, Grélaud C, Martin C, et al. First clinical isolate of vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus in a French hospital. Lancet 1998 ; 351 : 1212.
Poyart C, Quesne G, Boumaila C, Trieu-Cuot P. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the sodA gene as target. J Clin Microbiol 2001 ; 39 : 4296–301.
Rober J, Tristan A, Cavalié L, et al. On behalf of ONERBA. Toxin 1-positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus : a French multicenter prospective study in 2008. Antimicrob Agents Chemoter 2010 ; 55 : 1734–9.
Tenover FC, Arbeit R, Archer G, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 1994 ; 32 : 407–15.
Trienski TL, Barrett HL, Pasquale TR, et al. Evaluation and use of a rapid Staphylococcus aureus assay by an antimicrobial stewardship program. Am J Health Syst Pharm 2013 ; 70 : 1908–12.
Weist K, Cimbal AK, Lecke C, et al. Evaluation of six agglutination tests for Staphylococcus aureus identification depending upon local prevalence of meticillin-resistant S. aureus (MRSA). J Med Microbiol 2006 ; 55 : 283–90.

Adresse utile

Centre national de référence des staphylocoques
Centre de Biologie et de Pathologie Est – CBPE
Groupement Hospitalier Est
59, boulevard Pinel, 69677 Bron cedex
Tél. : 04 72 12 96 21

28.3 Famille des *Streptococcaceae* et des *Enterococcaceae*

J. Loubinoux, C. Plainvert, A. Tazi, C. Poyart

Introduction

Les familles des *Streptococcaceae* et des *Enterococcaceae* comprennent des cocci à Gram positif dépourvus de catalase et de cytochrome oxydase. Ils produisent de l'acide lactique par fermentation du glucose et sont anaérobies-aérotolérants. Parmi toutes ces bactéries, les espèces des genres *Streptococcus* et *Enterococcus* sont le plus souvent impliquées en pathologie humaine. D'autres genres apparentés peuvent occasionnellement être isolés chez l'homme. L'absence de catalase et l'aspect caractéristique en paires (diplocoques) ou en chaînettes permettent de les distinguer des *Micrococcaceae*. L'analyse de la structure chimique du peptidoglycane est à la base de la chimiotaxonomie qui a été particulièrement utilisée pour la classification des streptocoques. La classification de Lancefield repose sur les caractères antigéniques des polyosides de la paroi. Le polyoside C permet la caractérisation antigénique des streptocoques β-hémolytiques des groupes A, B, C, F et G par une technique rapide d'agglutination sur lame : le sérogroupage des streptocoques. Les acides lipotéïchoiques sont le support antigénique du groupe D, qui caractérise la plupart des espèces faisant actuellement partie du « complexe *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus* » ainsi que les entérocoques. L'antigène N des lactocoques est également lié à un acide lipotéichoïque.

L'identification des streptocoques et des genres apparentés repose sur l'étude des caractères morphologiques, culturaux, antigéniques et biochimiques, et sur l'étude de la résistance éventuelle à des antibiotiques tels que la vancomycine (Tableau 28.5). Les techniques moléculaires d'analyse des gènes des ARN ribosomiques ou de la superoxyde dismutase permettent l'identification des espèces difficiles à identifier par les techniques phénotypiques conventionnelles.

Le genre *Streptococcus*

Les streptocoques sont, parmi les bactéries étudiées dans ce chapitre, celles qui sont le plus souvent impliquées en pathologie humaine. Le genre *Streptococcus* comprend 113 espèces (janvier 2016). L'espèce type du genre est *S. pyogenes*, décrite en 1884. Certaines espèces très virulentes, comme *S. pyogenes* ou *S. pneumoniae*, sont des bactéries pathogènes responsables chez l'homme d'infections aiguës graves. D'autres espèces sont le plus souvent commensales mais deviennent des pathogènes « opportunistes » dans certaines circonstances (patients immunodéprimés). C'est le cas des streptocoques oraux qui peuvent être responsables d'endocardites ou de syndrome de détresse respiratoire. D'autres espèces déterminent des lésions d'évolution subaiguë, comme *Streptococcus mutans* qui peut être responsable de caries dentaires.

Les streptocoques se présentent sous l'aspect de cocci à Gram positif, de diamètre inférieur à 2 μm, immobiles et asporulés. Ils sont groupés en diplocoques ou en chaînettes de longueur variable (Fig. 28.8). En primoculture, certaines espèces ou souches se multiplient plus facilement en anaérobiose (*Streptococcus intermedius*) ou en présence de CO_2 (*S. pneumoniae*, *S. mutans*). Les streptocoques sont homofermentaires, catalase et oxydase négatifs. Ils se multiplient en milieu Man, Rogosa et Sharpe (MRS) sans production de gaz, contrairement à *Leuconostoc*. Les streptocoques nécessitent pour leur multiplication de nombreux facteurs de croissance présents dans les milieux de culture complexes, tels que les géloses (trypticase soja ou Columbia) enrichies

Tableau 28.5 **Caractères phénotypiques différentiels des principaux cocci à Gram positif catalase négative.**

	Abiotrophia	*Aerococcus*	*Alloiococcus*	*Enterococcus*	*Gemella*	*Granulicatella*	*Lactococcus*	*Leuconostoc*	*Pediococcus*	*Streptococcus*
Morphologie[1]	Cocci, coccobacilles et pseudobacilles	Cocci	Cocci	Cocci et coccobacilles	Cocci	Cocci, coccobacilles et pseudobacilles	Cocci et coccobacilles	Cocci et coccobacilles	Cocci	Cocci et coccobacilles
Groupement[1]	Chaînettes	Paires, tétrades et amas	Paires, tétrades et amas	Paires et chaînettes	Paires, tétrades et amas	Chaînettes	Paires et chaînettes	Paires et chaînettes	Paires, tétrades et amas	Diplocoques et chaînettes
Groupe de Lancefield	ng[2] ou H	ng	ng	D ou ng	ng	ng	N	ng ou D	ng ou D	A-H, K-M, O-V ou ng
Croissance en NaCl 6,5 %	–	+	+	+	–	–	V	V		–
Test bile-esculine	–	V	–	+	–	–	–	V	+	V
Production de gaz en milieu MRS	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
Production de :										
– Leucine aminopeptidase	+	V	+	+	+	+	+ V	–	+	+
– Pyrrolidonyl arylamidase	+	V	+	+[3]	+	+		–	–	–[4]
Sensibilité à la vancomycine[5]	S	S	S	S[6]	S	S	S	R	R	S

+ : > 85 % de souches positives ; – : < 15 % de souches positives ; V : caractère variable selon les souches.

[1] Morphologie et groupement observés après 24 ou 48 heures d'incubation en milieu liquide.

[2] ng : non groupable.

[3] Production de pyrrolidonyl arylamidase positive pour tous les entérocoques sauf ***E. cecorum, E. columbae*** et ***E. saccharolyticus***.

[4] Production de pyrrolidonyl arylamidase négative pour tous les streptocoques sauf ***S. pyogenes*** et les streptocoques d'origine animale ***S. porcinus*** et ***S. iniae***.

[5] S sensible : présence d'une zone d'inhibition autour du disque chargé à 30 µg de vancomycine ; R, résistant à la vancomycine : absence de zone d'inhibition.

[6] La plupart des entérocoques sont sensibles à la vancomycine sauf ***E. casseliflavus*** et ***E. gallinarum*** (résistance naturelle), ainsi que quelques souches d'***E. faecalis***, ***E. faecium*** (résistance acquise).

de 5 % de sang (de cheval, de mouton ou de lapin) et les bouillons à base de macération ou d'infusion de viande (Todd Hewitt, cœur-cervelle, MRS), qui peuvent être aussi enrichis de sang, de sérum ou d'autres suppléments. Les milieux réducteurs, type milieu de Schaedler ou bouillon au thioglycolate, favorisent leur métabolisme anaérobie préférentiel. Le bouillon glucosé tamponné, qui neutralise l'acide lactique produit par le métabolisme bactérien, est particulièrement utilisé pour la culture du pneumocoque. Avant l'utilisation des techniques de biologie moléculaire, la classification des streptocoques reposait essentiellement sur trois types de caractères : l'hémolyse entourant les colonies obtenues sur gélose au sang, le groupe de Lancefield et les propriétés physiologiques ou biochimiques. Cette approche qui repose sur les caractères culturaux (aspect et taille de la colonie, aspect et taille de l'hémolyse et atmosphère de croissance) reste utilisée en pratique courante pour l'identification. L'hémolyse permet la distinction des streptocoques β-hémolytiques, α-hémolytiques et non hémolytiques (Fig. 28.9 et 28.10). Elle permet de distinguer rapidement les streptocoques pyogènes, le plus souvent β-hémolytiques (mis à part *S. pneumoniae* qui est α-hémolytique et les streptocoques du groupe *anginosus* dont l'hémolyse est variable), pour lesquels l'identification repose sur le sérogroupage par une technique rapide d'agglutination sur lame (Fig. 28.11). L'analyse des souches pathogènes est complétée par la réa-



Fig. 28.9 Streptocoque β-hémolytique (*Streptococcus pyogenes*).

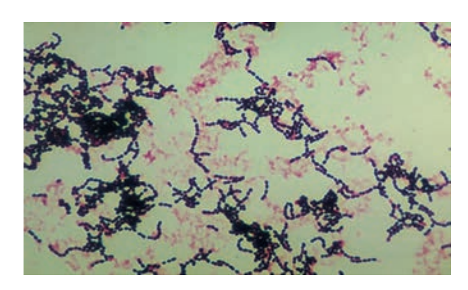


Fig. 28.8 Aspect des streptocoques après coloration de Gram.

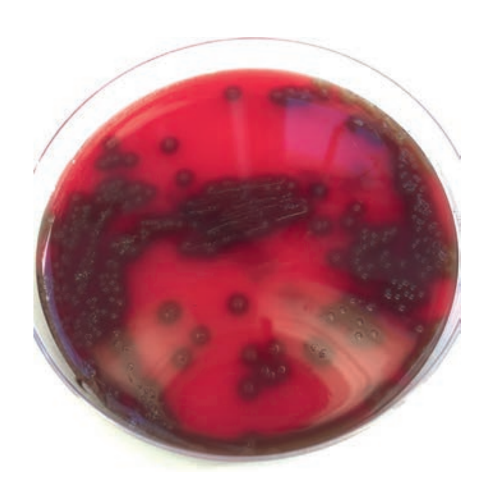


Fig. 28.10 Streptocoque α-hémolytique.

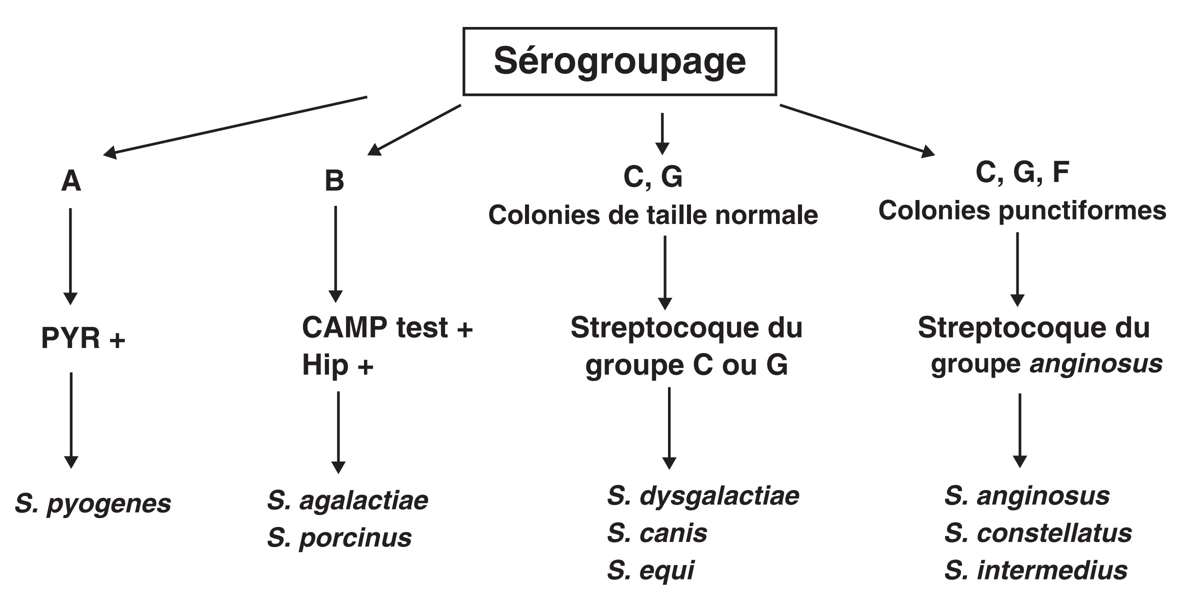


Fig. 28.11 Identification des streptocoques β-hémolytiques par sérogroupage de Lancefield (technique rapide d'agglutination sur lame).

lisation de tests biochimiques révélant la production d'enzymes ou l'hydrolyse de différents substrats, l'étude du profil de résistance aux antibiotiques et l'étude du profil protéique (spectrométrie de masse MALDI-TOF). Cette dernière technique d'identification bactérienne est de plus en plus souvent mise en œuvre. Indépendamment de la technique d'identification utilisée, les souches les plus difficiles à identifier sont les streptocoques des groupes *mitis* et *bovis/equinus* du fait de la proximité phénotypique et génétique entre les espèces au sein de chacun de ces groupes.

Streptocoques des groupes A, C et G : *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus dysgalactiae*

Streptocoque du groupe A : *Streptococcus pyogenes*

Identification

S. pyogenes est un streptocoque β-hémolytique (voir Fig. 28.9) qui possède l'antigène de groupe A. L'identification peut être confirmée par la recherche de pyrrolidonyl arylamidase (voir Fig. 28.11), absente de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* et des souches β-hémolytiques de *Streptococcus anginosus* et *Streptococcus constellatus* qui présentent occasionnellement un antigène du groupe A de Lancefield (Tableaux 28.5 et 28.6). D'autres caractères biochimiques (absence de production d'acétoïne déterminée par le test de Voges Proskauer) permettent aussi de distinguer *S. pyogenes* des souches β-hémolytiques des streptocoques du groupe *anginosus*. Enfin, la sensibilité à la bacitracine, autrefois utilisée, ne peut plus être considérée comme un test de confirmation de l'espèce *S. pyogenes* depuis la mise en évidence de souches résistantes.

Habitat, pouvoir pathogène et épidémiologie

S. pyogenes est un pathogène humain dont le réservoir naturel est constitué par le pharynx et la peau. *S. pyogenes* peut notamment être isolé chez des porteurs asymptomatiques au niveau du nasopharynx, de la peau, du vagin ou du rectum. Le taux de portage pharyngé asymptomatique, estimé à 5 % des adultes et 20 % des enfants, peut augmenter jusqu'à 25 % en cas d'angine voire 50 % en cas d'épidémie. Chez les soignants, le taux de portage pharyngé est estimé à 3 %. *S. pyogenes* est en outre responsable d'un large éventail de manifestations cliniques allant du simple portage asymptomatique à des infections invasives sévères pouvant compromettre rapidement le pronostic vital. La transmission interhumaine de *S. pyogenes* s'effectue par l'intermédiaire de gouttelettes provenant des voies aériennes supérieures ou par contact direct avec les lésions cutanées. Ce mode de

Tableau 28.6 **Caractères d'identification des principales espèces de streptocoques β-hémolytiques.**

	S. pyogenes	*S. agalactiae*	*S. porcinus* et *S. pseudoporcinus*	*S. equi* subsp. *equi*	*S. equi* subsp. *ruminatorum*	*S. equi* subsp. *zooepidemicus*	*S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*	*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*	*S. canis*	*S. iniae*	Streptocoques du groupe *anginosus*
Groupe de Lancefield	A	B	B[1], E, P, U, V ou ng[2]	C	C	C	C	C, G, A ou L	G	ng	F, C, A ou G[4]
Hémolyse	β	β	β[3]	β	β	β	β	β	β	β	α, β ou nh [2]
– CAMP-test	–	+	+	–	+	–	–	–	+	+	–
Hydrolyse de :											
– Esculine	–	–	+	V	–	V	V	V	+	+	V
– Hippurate	–	+	+	–	+	–	V	–	–	–	–
Production de :											
– Pyrrolidonyl arylamidase	+	–	V	–	–	–	–	–	–	+	–
– Acétoïne	–	+	V	–	–	–	–	–	–	–	+
Fermentation du :											
– Lactose	+	V	–	–	+	+	+	V	+	–	V
– Sorbitol	–	–	+	–	+	+	V	–	–	–	–
– Ribose	–	+	+	–	+	–	+	V	+	+	–
– Mannitol	–	–	+	–	–	–	–	–	–	+	V

+ : > 85 % de souches positives ; – : < 15 % de souches positives ; V : caractère variable selon les souches.
[1] 50 % des souches d'origine humaine de *S. porcinus* agglutinent avec l'antisérum révélant l'antigène de Lancefield du groupe B.
[2] ng : non groupable ; nh : non hémolytique.
[3] *S. porcinus* diffère macroscopiquement de *S. agalactiae* par un aspect plus étalé des colonies et une large zone d'hémolyse β autour des colonies.
[4] Colonies punctiformes de très petite taille.

transmission favorise la dissémination de *S. pyogenes* dans la population sur un mode épidémique. Parmi les infections à *S. pyogenes*, on distingue par ordre de gravité (1) les infections invasives qui restent rares mais sont les plus sévères, (2) les infections non invasives plus fréquentes et souvent bénignes, et (3) les séquelles poststreptococciques de natures auto-immunes.

Les infections invasives à *S. pyogenes* sont définies par l'isolement de bactéries à partir d'un site anatomique normalement stérile ou bien par l'isolement de bactéries à partir d'un site non stérile mais en association avec des signes cliniques de syndrome de choc toxique streptococcique (SCTS). Les manifestations cliniques des infections invasives à *S. pyogenes* sont très diverses et concernent de multiples organes. Les plus fréquentes sont les infections des tissus mous, dont la forme la plus sévère est la dermo-hypodermite nécrosante (DHN), et les septicémies sans foyer (Fig. 28.12). Les autres formes cliniques invasives, moins fréquentes, sont représentées par des infections gynéco-obstétricales, des infections ostéoarticulaires, des pleuropneumopathies et, plus rarement, des infections abdominales, ORL et des méningites et même des toxi-infections alimentaires. Chacun de ces types de manifestations cliniques peut se compliquer d'un SCTS associé à une mortalité de 45 %. Le SCTS et la DHN constituent ainsi les manifestations cliniques les plus graves.

À l'échelle mondiale, les infections invasives à *S. pyogenes* sont estimées chaque année à 663 000 nouveaux cas et 163 000 décès. Des incidences comparables oscillant entre 1,5 et 5,2 cas pour 100 000 habitants sont rapportées dans les pays européens et nord-américains. La mortalité associée à ces infections invasives à *S. pyogenes* est estimée entre 12,5 et 19 % selon les séries et s'élève à 45 % lorsqu'un SCTS vient compliquer le tableau clinique. En France, la surveillance des infections invasives à *S. pyogenes* est assurée conjointement par l'Institut national de veille sanitaire (InVS) à travers le réseau national Epibac et le Centre national de référence des streptocoques (CNR-Strep, www.cnr-strep.fr). L'incidence des infections invasives à *S. pyogenes* a augmenté en France métropolitaine entre 1995 et 2004, passant de 0,8 à 2,2 cas pour 100 000 habitants selon les données Epibac. Ces données sont confirmées par l'étude prospective réalisée en 2007 par l'InVS en collaboration avec le CNR-Strep, au cours de laquelle l'incidence des infections invasives à *S. pyogenes* atteignait 3,1 cas pour 100 000 habitants en France métropolitaine.

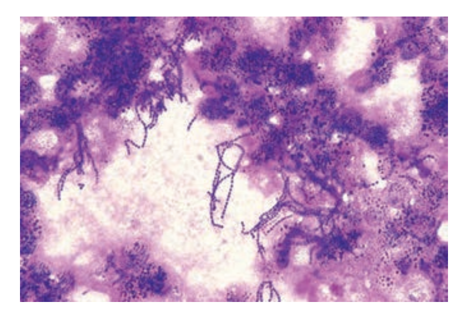


Fig. 28.12 Examen direct (coloration de Gram) à partir d'un flacon d'hémoculture positif à *Streptococcus pyogenes*.

Les infections non invasives à *S. pyogenes* sont majoritairement représentées par les angines, *S. pyogenes* étant le premier agent responsable d'angine bactérienne. L'incidence mondiale des angines à *S. pyogenes* est évaluée à 14 % chez les enfants d'âge scolaire chaque année alors que chez les adultes cette incidence est plus faible, variant entre 4 et 10 %. L'angine à *S. pyogenes* peut s'accompagner d'une éruption érythémateuse associée à un aspect framboisé de la langue. Ces manifestations sont liées à la sécrétion d'une toxine érythrogène, dont la forme typique est la scarlatine. Les autres infections non invasives à *S. pyogenes* incluent des infections cutanéomuqueuses (anite, cellulite, impétigo, vulvite, etc.) et des infections de la sphère ORL (mastoïdite, otite, phlegmon périamygdalien, sinusite, etc.).

Les principales complications poststreptococciques sont le rhumatisme articulaire aigu (RAA) et la glomérulonéphrite aiguë (GNA). Elles surviennent à distance d'une infection aiguë à *S. pyogenes*.

Parmi les nombreux facteurs de virulence de *S. pyogenes*, la protéine M tient une place particulière. D'une part, il s'agit d'une protéine de surface qui constitue un facteur de virulence majeur de *S. pyogenes*, et d'autre part, cette protéine joue un rôle fondamental dans le typage des souches de *S. pyogenes*. La protéine M, de structure fibrillaire, est constituée de deux chaînes polypeptidiques dont l'extrémité N-terminale est immunogène et présente une grande diversité antigénique. Cette propriété est à la base du sérotypage des souches de *S. pyogenes* développé par Rebecca Lancefield. Néanmoins, cette technique par agglutination tend à être remplacée par le typage moléculaire du gène *emm* qui code la protéine M. Le génotypage consiste à amplifier l'extrémité 5′- variable du gène *emm*, puis à la séquencer pour la comparer à la banque de données des séquences de référence du Centers for Disease Control and Prevention (CDC) aux États-Unis. Le génotypage moléculaire a permis d'identifier plus de 225 génotypes *emm* différents et constitue le marqueur épidémiologique principal de *S. pyogenes*. Les génotypes *emm1* et *emm3* sont plutôt associés aux DHN et SCTS, et le génotype *emm28* aux infections du post-partum.

Streptococcus dysgalactiae

S. dysgalactiae comprend actuellement deux sous-espèces : *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* et *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE). *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* comprend les souches α-hémolytiques du groupe C d'origine animale et SDSE comprend les souches β-hémolytiques des groupes C ou G (rarement A ou L) d'origine humaine ou animale. Ces deux sous-espèces se distinguent entre elles par leurs caractères biochimiques (Tableau 28.6). De plus, la négativité du test de détection rapide de la pyrrolidonyl arylamidase permet aussi de les distinguer facilement des souches de *S. pyogenes* (Fig. 28.11). D'autres tests biochimiques permettent de les distinguer des streptocoques du groupe *anginosus* (Tableau 28.6). SDSE est phylogénétiquement très proche de *S. pyogenes,* ces deux espèces étant à l'origine de manifestations cliniques similaires chez l'homme. À partir de son réservoir naturel constitué principalement par la peau et le pharynx, SDSE peut être à l'origine d'infections non invasives bénignes ou d'infections invasives graves, associées ou non à un SCTS. Les infections

invasives sont variées : infections cutanées et des tissus mous (dermohypodermite nécrosante ou DHN), septicémies, infections ostéoarticulaires, péritonites, endométrites, pleuropneumopathies, méningites et endocardites. Les infections non invasives comprennent principalement des angines et des infections cutanées (abcès, cellulite, érysipèle, surinfection de plaie). Les angines, décrites chez l'adulte et l'enfant, peuvent évoluer sur un mode épidémique. Enfin, de rares cas de rhumatisme articulaire aigu et de glomérulonéphrite aiguë associés à un portage pharyngé de SDSE ont été rapportés. La physiopathologie des infections à SDSE fait intervenir de multiples facteurs de virulence dont un certain nombre résulte de transferts horizontaux de gènes entre SDSE et *S. pyogenes*. Comme *S. pyogenes*, SDSE a une protéine M de surface, facteur de virulence majeur, codée par le gène *emm* dont plus de 50 génotypes *emm* différents ont été décrits. Les trois plus fréquents génotypes *emm* responsables d'infections invasives en France entre 2006 et 2010 sont *stG6*, *stG485* et *stG6792*.

Streptocoque du groupe B : *Streptococcus agalactiae*

Initialement isolé de lésions mammaires des bovidés, *S. agalactiae* est une bactérie capsulée commensale du tube digestif et des voies vaginales de nombreux mammifères, isolée chez 10 à 30 % des individus sains. Il s'agit de l'une des principales espèces pathogènes chez l'homme, particulièrement virulente aux âges extrêmes de la vie. *S. agalactie* est considéré comme le premier agent responsable d'infections néonatales bactériennes invasives et comme un pathogène opportuniste d'importance croissante chez l'adulte de plus de 65 ans. Les antigènes polyosidiques de capsule (Ia, Ib, II à IX) exprimés par les souches de *S. agalactiae* sont à la base du typage et de l'épidémiologie des streptocoques du groupe B.

Identification

S. agalactiae est reconnu par la morphologie de ses colonies, de taille moyenne, parfois muqueuses ou pigmentées, masquant une zone étroite d'hémolyse de type β due à une hémolysine spécifique (Fig. 28.13). Cette hémolyse est absente dans 1 à 7 % des cas. La gélose Granada incubée en anaérobiose permet d'exacerber l'expression du pigment caractéristique et les colonies apparaissent alors de couleur orange à rouge brique (Fig. 28.14). L'expression de l'hémolyse et du pigment étant indissociables, la même proportion de souches, soit 1 à 7 %, n'est pas pigmentée sur gélose Granada mais de couleur blanche. En présence d'une souche de *Staphylococcus aureus* productrice de sphingomyélinase, le CAMP test réalisé sur gélose au sang de mouton donne une image caractéristique d'exacerbation de l'hémolyse de *S. agalactiae*, témoignant de l'action synergique de l'hémolysine staphylococcique et du facteur CAMP sécrété par *S. agalactiae* (Fig. 28.15). La présence de l'antigène du groupe B, la positivité du CAMP test et la positivité du test hippurate sont des caractères constants qui permettent la reconnaissance de l'espèce en pratique courante (Fig. 28.11 et Tableau 28.6). Quelques souches de *Streptococcus porcinus* peuvent présenter une fausse réaction d'agglutination de groupe B mais, contrairement à *S. agalactiae*, elles sont

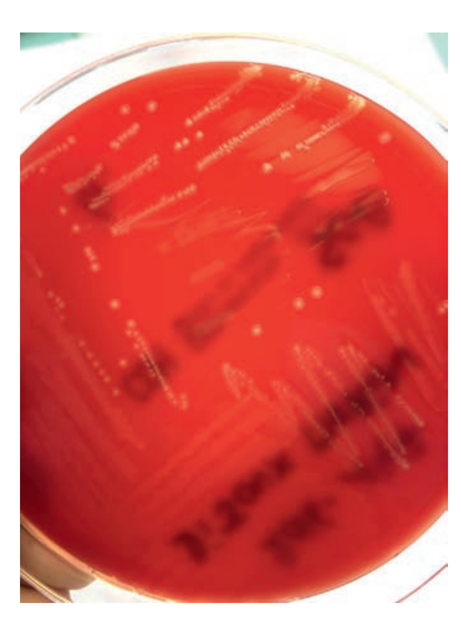


Fig. 28.13 **Colonies de *Streptococcus agalactiae* sur gélose au sang.**



Fig. 28.14 **Colonies de *Streptococcus agalactiae* sur gélose Granada.**

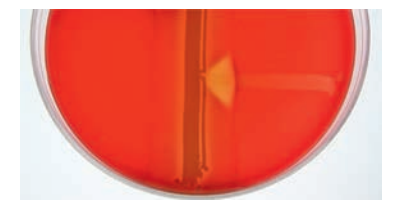


Fig. 28.15 **CAMP-test positif.**

entourées d'une très large zone d'hémolyse β et ne sont pas pigmentées. *Streptococcus difficilis*, qui avait été individualisé comme l'agent responsable de méningo-encéphalites mortelles chez les poissons d'élevage, est désormais considéré comme un variant non hémolytique de *S. agalactiae*.

Toutefois, il se distingue des autres souches de *S. agalactiae* par une température optimale de croissance de 30 °C.

Pouvoir pathogène et épidémiologie

Infections néonatales

Malgré la mise en place de stratégies de prévention, *S. agalactiae* demeure la première cause d'infections néonatales bactériennes dans le monde industrialisé. Ces infections se manifestent principalement par des septicémies et des méningites. Elles sont grevées d'une mortalité importante (environ 10 %) et s'accompagnent, pour les enfants survivants, de séquelles neurologiques dans près de 30 % des cas. L'infection néonatale se manifeste par deux syndromes distincts : un syndrome précoce survenant au cours de la première semaine de vie ou un syndrome tardif se déclarant de 7 jours à 3 mois après la naissance. En l'absence d'antibioprophylaxie, l'infection se développe chez 2 % des nouveau-nés colonisés à la naissance par *S. agalactiae*. Les nouveau-nés les plus à risque sont les prématurés et les nouveau-nés à faible poids de naissance. Les sérotypes capsulaires les plus représentés dans les infections néonatales sont les sérotypes Ia et III.

Infections au cours de la grossesse

Le taux de colonisation vaginale par *S. agalactiae* varie, en Europe, selon les pays et les études, entre 6,5 et 36 %. Au cours de la grossesse, en particulier dans des contextes de rupture prématurée des membranes, la colonisation vaginale peut conduire à une contamination amniotique et à des chorioamniotites et endométrites qui aboutissent à une mort fœtale in utero dans près de 60 % des cas. Des complications telles que septicémies et endométrites peuvent également survenir au cours du post-partum. Une association entre colonisation à *S. agalactiae* et prématurité ou rupture prématurée des membranes a été suggérée mais reste controversée.

Infections chez l'adulte en dehors de la grossesse

L'incidence des infections invasives à *S. agalactiae* est en constante augmentation depuis la fin des années 1990, en particulier chez les patients de plus de 65 ans. *S. agalactiae* se comporte comme un pathogène opportuniste chez les sujets atteints d'une grande diversité de pathologies sous-jacentes, en particulier diabète, cancers, pathologies cardiovasculaires. Les tableaux cliniques les plus fréquents sont des bactériémies isolées, des infections ostéoarticulaires, des infections de la peau et des tissus mous et des infections urinaires. Les principaux sérotypes capsulaires responsables d'infections dans ce contexte sont les sérotypes Ia, III et V.

Streptococcus pneumoniae

S. pneumoniae appartient aux streptocoques du groupe *mitis* (voir plus loin le paragraphe « Streptocoques oraux »). *S. pneumoniae*, appelé pneumocoque, est une bactérie capsulée, commensale des voies aériennes supérieures. L'un des éléments majeurs de virulence du pneumocoque repose sur la capsule. Elle est constituée de macromolécules polyosidiques et, classiquement, seules les souches capsulées possèdent un pouvoir pathogène expérimental. La structure antigénique de la capsule permet un sérotypage des souches (classification de Lund) ; 93 sérotypes sont actuellement décrits. Le pneumocoque peut être responsable d'infections respiratoires hautes (otites moyennes aiguës, sinusites) ou basses (pneumonies), mais aussi d'infections invasives, bactériémies, pleurésies ou méningites. C'est la première cause de méningites en France.

En 2004, une espèce très proche de *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, a été décrite (diagnostic différentiel, voir paragraphe « Streptocoques du groupe *mitis* »).

Identification

Au Gram, les pneumocoques présentent une morphologie caractéristique ; ce sont des cocci à Gram positif, groupés en diplocoques, lancéolés et capsulés en forme de 8 ou présentant un aspect en « flamme de bougie » (voir Fig. 28.17). Dans les produits pathologiques tels que LCR, autres liquides de ponction ou prélèvements pulmonaires, la présence de cocci à Gram positif en diplocoques entourés d'un halo intra- ou extraleucocytaire (Fig. 28.16) est en faveur d'une infection à pneumocoque. Des aspects atypiques peuvent être observées (Gram douteux, formes en chaînettes, ou encore pseudobacillaires) sur des produits pathologiques notamment après mise sous traitement (Fig. 28.17).

Les colonies ont généralement une taille de 0,5 à 1,5 mm et sont entourées d'une α-hémolyse ; elles sont opaques ou grisâtres, à bord régulier, et bombées. En primoculture, les colonies en forme de dôme se creusent au centre sous l'action d'autolysines pour donner un aspect en anneau déprimé en son centre. Cette forme ombiliquée est spécifique du pneumocoque (Fig. 28.18C). Les souches de sérotype 3 donnent des colonies muqueuses du fait d'une exubérance de la capsule (Fig. 28.18A).

En bouillon nutritif, les pneumocoques ne peuvent survivre qu'en milieu glucosé tamponné ; sinon, la fermentation du glucose en acide lactique abaisse le pH, rendant le milieu hostile. La croissance du pneumocoque est granulaire, avec un surnageant limpide voire légèrement trouble.

L'identification du pneumocoque repose sur la sensibilité à l'optochine (Fig. 28.19). Si une zone d'inhibition d'au moins 15 mm apparaît autour du disque, le test est alors considéré comme positif (sensibilité). Le pneumocoque est généralement sensible à l'optochine, mais 5 % des souches peuvent être résistantes.

Parmi les streptocoques, seuls les pneumocoques sont solubles dans la bile. Le test consiste à préparer une suspension dense à partir d'une culture pure de 18 heures sur gélose

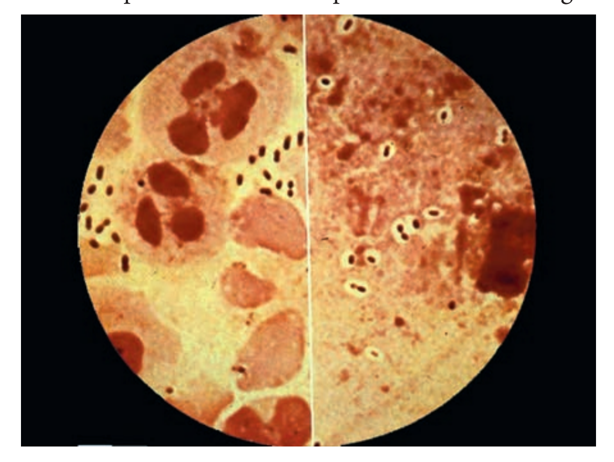


Fig. 28.16 **Gram d'un LCR positif à *S. pneumoniae*.**

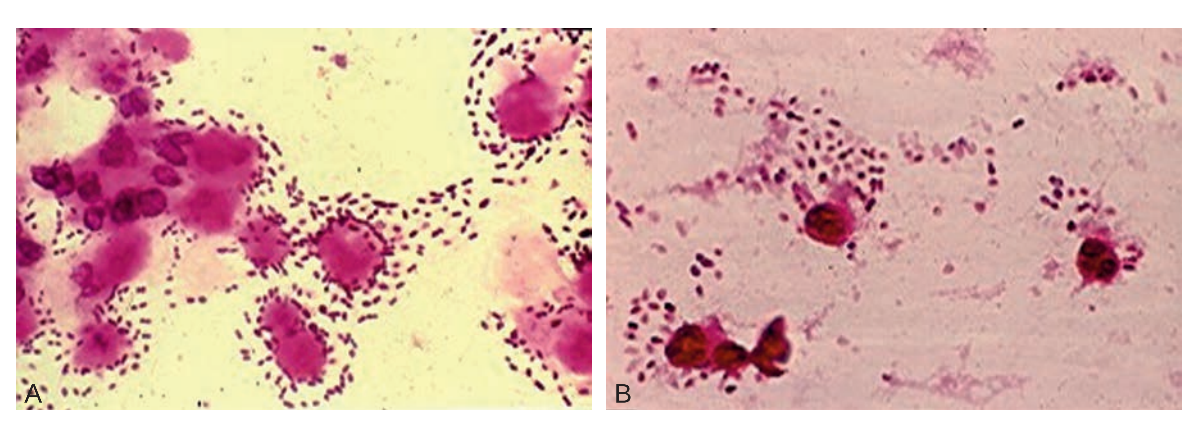


Fig. 28.17 Examen direct d'un LCR d'une méningite à *S. pneumoniae*. **A.** Avant traitement (aspect caractéristique). **B.** Après traitement (Gram douteux, protoplastes).

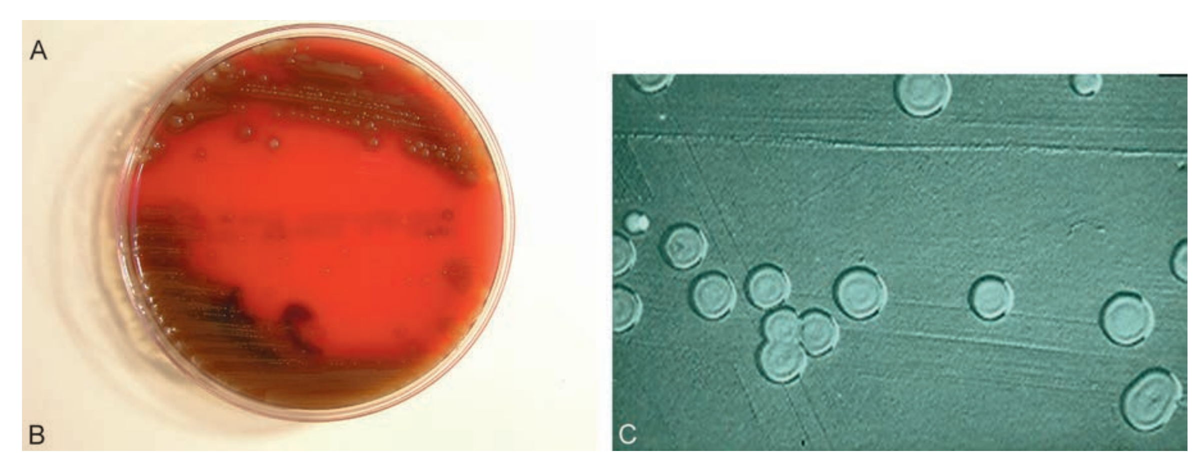


Fig. 28.18 Deux souches de *S. pneumoniae*. **A.** Muqueuse (sérotype 3). **B.** Non muqueuse. **C.** Colonies ombiliquées.



Fig. 28.19 Sensibilité à l'optochine d'une souche de pneumocoque.

au sang. À 500 µl de cette suspension, ajouter deux gouttes d'une solution de désoxycholate de sodium à 10 %. Après 30 minutes à 37 °C, on note, en cas de positivité, un éclaircissement de la solution par comparaison avec une suspension témoin où le désoxycholate de sodium est remplacé par une solution tampon (phosphate de potassium 1 M pH 8,0).

En cas de doute, la biologie moléculaire peut permettre de confirmer rapidement l'identification de la souche. Elle consiste en l'utilisation d'une PCR spécifique. Les gènes cibles les plus usités sont le gène *lytA* de l'autolysine, le gène *pno* de la pneumolysine et le gène *capsA*.

Après avoir porté le diagnostic d'espèce *S. pneumoniae*, on peut déterminer le sérotype selon la classification de Lund. Cela peut être effectué par agglutination avec des particules de latex sensibilisées avec des anticorps spécifiques de chaque sérotype ou par biologie moléculaire.

La spécificité de l'identification MALDI-TOF est variable selon les automates.

Pouvoir pathogène et épidémiologie

Les infections graves à pneumocoque sont observées aux âges extrêmes de la vie avec une morbimortalité élevée. En France, un réseau de surveillance des infections invasives à pneumocoques permet une surveillance des cas. Ce réseau regroupe l'InVS, le CNR des pneumocoques et les Observatoires régionaux du pneumocoque. Entre 2009 et 2014, l'incidence des infections invasives à pneumocoques a diminué dans tous les groupes d'âge. Dans le même temps, la proportion de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) a aussi baissé pour atteindre 21 % en

2014. La proportion de souches résistantes aux macrolides a aussi diminué ; cependant, elle reste à un niveau élevé, autour de 25 %. Cette évolution reflète l'impact de la vaccination de tous les enfants de moins de 2 ans par le vaccin conjugué à 7 puis 13 valences (contenant les sérotypes 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7 F, 9 V, 14, 18C, 19A, 19 F et 23 F) qui a permis la diminution drastique d'infections invasives dues à des sérotypes fréquemment retrouvés en portage et résistants aux antibiotiques. Néanmoins, une surveillance continue est nécessaire car des sérotypes de remplacement sont apparus dans les infections invasives, tels que d'une part les sérotypes 10A, 12 F et 22 F sensibles aux β-lactamines, et d'autre part les sérotypes 15A, 23A, 23B, 24 F, 35B, de sensibilité diminuée aux β-lactamines.

Streptocoques oraux (streptocoques des groupes *anginosus, salivarius, mitis, mutans*)

Les streptocoques oraux ont pour habitat principal les muqueuses de l'oropharynx et des voies aériennes supérieures. Ils étaient auparavant appelés « streptocoques *viridans* » du fait de leur caractère α-hémolytique en culture, par opposition aux streptocoques pyogènes β-hémolytiques. Ils sont en fait le plus souvent α- ou non hémolytiques et comprennent un grand nombre d'espèces commensales des muqueuses de l'homme et des animaux.

Le pouvoir pathogène de ces streptocoques oraux est variable. Ces espèces commensales de la cavité buccale et des muqueuses respiratoire, intestinale et génito-urinaire peuvent être responsables, dans certaines circonstances (malades neutropéniques), d'infections graves : septicémies, endocardites, pneumopathies, suppurations profondes et méningites.

Streptocoques du groupe *anginosus*

Les espèces de ce groupe sont *S. anginosus*, *S. constellatus* et *S. intermedius*. Elles étaient réunies autrefois sous l'appellation « streptocoques *milleri* ». Leur identification est orientée par leur croissance lente ou difficile, ainsi que par la taille et l'odeur particulière des colonies. En effet, la croissance bactérienne est favorisée par une atmosphère enrichie avec 5 % de CO_2 et certaines souches ne poussent que sous atmosphère anaérobie (plus fréquemment pour *S. intermedius*). Les colonies sont de petite taille « en tête d'épingle » (notamment par rapport à celles de *S. pyogenes*) et ont une odeur de caramel. Les souches α- ou non hémolytiques sont les plus fréquentes, mais il existe des souches β-hémolytiques pour chacune de ces espèces. Les souches β-hémolytiques sont plus fréquentes pour *S. constellatus* que pour *S. anginosus*. *S. intermedius* est rarement β-hémolytique. Les souches β-hémolytiques peuvent avoir les antigènes des groupes F, C ou G (par ordre de fréquence décroissante) (voir Fig. 28.11). Les streptocoques du groupe *anginosus* sont caractérisés par la production d'acétoïne (réaction de Voges-Proskauer positive), de phosphatase alcaline et par l'hydrolyse de l'arginine (Tableau 28.7). À la différence des autres streptocoques oraux, les streptocoques du groupe *anginosus* sont fréquemment responsables d'infections chez des individus au préalable en bonne santé et non immunodéprimés. Ce sont des commensaux des muqueuses qui peuvent être responsables de suppurations profondes de localisations diverses (pharyngées, cutanées, pleuropulmonaires, intestinales et génitales).

Streptocoques du groupe *mitis*

Ce groupe comprend le pneumocoque, *S. pneumoniae*, et des espèces commensales de l'oropharynx de l'homme : *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. parasanguinis* et *S. gordonii*. Six nouvelles espèces ont été rapprochées récemment des espèces du groupe *mitis* : *S. australis*, *S. infantis*, *S. cristatus*, *S. peroris*, *S. oligofermentans* et *S. sinensis*. La principale espèce pathogène de ce groupe est *S. pneumoniae*. Contrairement à *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae* n'a pas de capsule et n'est pas soluble dans la bile. Il est résistant à l'optochine (diamètre < 14 mm) sous 5 % de CO_2 et sensible à l'optochine (diamètre > 14 mm) sous air ambiant. Son importance clinique n'est pas connue. Les espèces du groupe *mitis* ont une grande parenté génétique qui explique les nombreux échanges génétiques par transformation entre ces bactéries. Leur identification par la détermination des caractères physiologiques et biochimiques est donc particulièrement difficile (voir Tableau 28.7). Les techniques récentes d'identification (spectrométrie de masse MALDI-TOF et séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S) ne permettent pas toujours de les différencier.

Streptocoques du groupe *mutans*

Ce groupe rassemble des souches α- ou non-hémolytiques appartenant aux espèces suivantes : *S. criceti*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. mutans*, *S. ratti* et *S. sobrinus*. Les principales espèces isolées chez l'homme sont *S. mutans* et *S. sobrinus*.

Streptocoques du groupe *salivarius*

Ce groupe comprend *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus vestibularis* et *Streptococcus thermophilus*. *S. salivarius* et *S. vestibularis* font partie de la flore oropharyngée, buccale et salivaire de l'homme. *S. thermophilus* est utilisé dans l'industrie laitière pour la production des fromages. Ces espèces sont phénotypiquement et génétiquement proches des streptocoques du groupe D et ont un pouvoir pathogène limité.

Streptocoques du complexe *Streptococcus bovis/Streptococcus equinus*

Communément désignés sous le nom de streptocoques du groupe D, les streptocoques du complexe *bovis/equinus* constituent un ensemble hétérogène de streptocoques non β-hémolytiques commensaux de la flore intestinale de nombreux mammifères et d'animaux domestiques en particulier. Les espèces qui le constituent peuvent être isolées d'environnements variés (prélèvements cliniques et aliments) et sont associées à un large éventail de pathologies animales et humaines.

Évolution de la classification

La classification de cet ensemble de streptocoques a été largement remaniée depuis les premières descriptions de *S. equinus* et *S. bovis*. La diversité phénotypique au sein du groupe *bovis/equinus* a rapidement nécessité une classifi-

Tableau 28.7 **Caractères biochimiques différentiels des principales espèces de streptocoques oraux.**

	S. anginosus	***S. constellatus***	***S. gordonii***	***S. intermedius***	***S. mitis***	***S. mutans***	***S. oralis***	***S. parasanguinis***	***S. salivarius***	***S. sanguinis***
Culture sur gélose au sang										
– Atmosphère préférentielle	CO_2	CO_2		Anaérobiose		CO_2				
– Hémolyse[1]	α, β ou nh	α, β ou nh	α ou nh	α, β ou nh	α ou nh	α ou nh	α ou nh	α ou nh	α ou nh	α ou nh
Production d'acétoïne	+	+	–	+	–	+	–	–	+	–
Hydrolyse de :										
– Arginine	+	+	V	+	–	–	–	V	–	+
– Esculine	+	–	+	+	–	+	–	V	–	V
Production de :										
– Pyrrolidonyl arylamidase	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
– Phosphatase alcaline	+	+	+	+	V	–	V	V	V	V
– N-acétyl-ß-glucosaminidase	–	–	–	+	–	–	V	–	–	–
– α-galactosidase	V	–	V	–	V	V	V	V	–	V
– ß-galactosidase substrat 1, b-GAL[2]	V	–	–	V	V	–	V	+	V	–
– ß-galactosidase substrat 2, b-GAR[2]	V	–	+	+	V	–	V	+	V	–
– ß-glucosidase	+	–	+	+	–	+	–	V	+	V
– ß-glucuronidase	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
– ß-mannosidase	–	–	+	V	–	–	–	+	–	–
Fermentation du :										
– Raffinose	V	–	–	–	V	V	V	V	+	V
– Mannitol	V	–	–	–	–	+	–	–	–	V
– Sorbitol	–	–	–	–	–	+	–	–	V	V
– Inuline	–	–	+	–	–	+	–	–	V	V
Polysaccharide extracellulaire	–	–	Dextrane	–	–	Dextrane	Dextrane	–	Lévane	Dextrane
Groupe de Lancefield[3]	F, C, A, G ou ng	F, C, A, G ou ng		F, C, A, G ou ng						

+ : > 85 % de souches positives ; – : < 15 % de souches positives ; V : caractère variable selon les souches.
[1] a, hémolyse de type a ; b, hémolyse de type b ; nh, absence d'hémolyse.
[2] La galerie rapid ID32 STREP® permet la recherche de β-galactosidase à l'aide de deux substrats différents.
[3] Le groupe de Lancefield est déterminé pour les souches β-hémolytiques ; ng : non groupable.

cation en biotypes, fondée sur leur capacité à acidifier le mannitol (biotype I) ou non (biotype II). Puis, le biotype II a été subdivisé en deux groupes : le groupe II.1, comprenant la souche type de *S. bovis*, et le groupe II.2. Les techniques de biologie moléculaire et l'analyse des séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S, *groEL* et *sodA* ont par la suite permis la distinction de différents groupes taxonomiques et la description de nouvelles espèces. Actuellement, le complexe *bovis/equinus* est constitué de 7 sous-espèces classées dans 4 branches, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. infantarius* subsp. *infantarius*, *S. lutetiensis*, *S. alactolyticus* et *S. equinus*, ce dernier étant encore fréquemment désigné *S. bovis* (Tableau 28.8). La distinction entre *S. bovis* et *S. equinus*, qui reposait sur des caractères phénotypiques, était en contradiction avec le fait que les souches types de chacune de ces espèces appartiennent au même groupe génomique. Les révisions récurrentes et massives de la taxonomie et de la

Tableau 28.8 **Évolution de la classification des streptocoques du complexe *S. bovis/S. equinus*.**

Ancienne dénomination	Biotype	Synonymes (dont révoqués)	Classification actuelle
S. alactolyticus	Variable	*S. intestinalis* (révoqué)	*S. alactolyticus*
S. bovis	Biotype I	*S. caprinus* (révoqué)	*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*
	Biotype II.1		*S. infantarius* subsp. *infantarius*
		S. infantarius subsp. *coli*	*S. lutetiensis*
	Biotype II.2	*S. pasteurianus*	*S. pasteurianus* ou *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*
S. equinus	Principalement *S. bovis* biotype II.1	*S. bovis*	*S. equinus*
S. macedonicus	Principalement *S. bovis* biotype II.1	*S. waius* (révoqué)	*S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*

phylogénie du complexe *bovis/equinus* ont été accompagnées par la description et l'abandon de plusieurs dénominations, ce qui a entraîné une grande confusion dans la désignation des espèces pour les microbiologistes et dans la littérature. *S. intestinalis*, qui était placé dans l'ensemble des streptocoques pyogènes du fait de son caractère hémolytique et de la présence d'antigène du groupe G, est synonyme de *S. alactolyticus*. De même, *S. waius* est confondu avec *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* (Tableau 28.8).

Identification

Les streptocoques du complexe *bovis/equinus* donnent de petites colonies, non pigmentées ou légèrement crèmes, qui sont α- ou non hémolytiques sur gélose au sang. En plus de la présence inconstante de l'antigène de groupe D, les espèces du complexe *S. bovis/S. equinus* partagent avec les entérocoques la capacité de croissance sur milieu bile-esculine avec noircissement de la gélose et, pour certaines espèces, la capacité de croissance aux températures de 10 °C et de 45 °C. Cependant, elles se distinguent des entérocoques par l'absence de croissance sur milieu ordinaire, en bouillon hypersalé, ainsi que par l'absence de production de pyrrolydonyl arylamidase. L'identification des différentes espèces repose sur la détermination de leur profil biochimique (Tableau 28.9). La différenciation de *S. bovis* et *S. equinus* en deux espèces, selon que les souches produisent

Tableau 28.9 **Caractères d'identification des streptocoques du complexe *S. bovis/S. equinus*.**

	S. bovis/ S. equinus	*S. gallolyticus* subsp.			*S. infantarius* subsp. *infantarius*	*S. lutetiensis*	*S. alactolyticus*
		gallolyticus	*pasteurianus*	*macedonicus*			
Hydrolyse de l'esculine	+	+	+	–	V	+	+
Production de :							
– α-galactosidase	+/–	+	V	V	+	+	+
– β-galactosidase	–	–	+	V	–	–	–
– β-glucosidase	+	+	+	–	V	+	+
– β-glucuronidase	–	–	+	–	–	–	–
– β-mannosidase	–	V	+	–	–	–	–
Hydrolyse du gallate	–	+	–	–	–	–	–
Fermentation :							
– Amidon	+/–	+	–	–	+	V	V
– Glycogène	+/–	+	–	–	+	–	–
– Inuline	V	+	–	–	–	–	–
– Lactose	+/–	+	+	+	+	+	–
– Mannitol	–	+	–	–	–	–	V
– Mélibiose	V/–	V	–	V	+	–	V
– Méthyl-β-D-glucopyranoside	+	+	+	–	V	+	+
– Pullulane	V/–	+	–	–	+	–	–
– Raffinose	+/–	V	V	+	+	V	+
– Tréhalose	V	+	+	–	–	–	–
Groupe de Lancefield (inconstant)	D	D	D	F	D	D	D

+ : > 85 % de souches positives ; – : < 15 % de souches positives ; V : caractère variable selon les souches.

une α-galactosidase et hydrolysent ou non l'amidon et le raffinose, n'est plus justifiée. L'isolement quasi exclusif en pathologie humaine des biotypes rattachés antérieurement à *S. bovis* (biotypes I, II.1 et II.2) et la lente évolution des habitudes conduit à préciser encore le biotype, qui permettait antérieurement de les distinguer (voir Tableau 28.8). L'ancien biotype I de *S. bovis*, qui correspond à *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, est caractérisé par la production d'acide lactique par fermentation du mannitol et par l'hydrolyse de l'ester méthylique de l'acide gallique. La plupart des autres espèces ou sous-espèces ne fermentent pas le mannitol. *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* correspond à l'ancien biotype II.2 de *S. bovis*. Les souches β-glucosidase positives hydrolysant l'esculine de *S. infantarius* correspondent à l'ancien biotype II.1 de *S. bovis*. Les souches de *S. infantarius* subsp. *infantarius* qui ne possèdent pas de β-glucosidase, de même que celles de *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, sont difficiles à identifier par les techniques phénotypiques usuelles. Leur identification est donc fondée principalement sur des techniques de biologie moléculaire et l'analyse de séquence du gène codant pour l'ARNr 16S, du gène *sodA* ou du gène *groEL*. Les techniques utilisant la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) ont également été utilisées avec succès pour l'identification au rang de l'espèce des streptocoques du complexe *bovis/equinus*.

Habitat et pouvoir pathogène

S. equinus, S. gallolyticus subsp. *gallolyticus, S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* et *S. infantarius* sont des espèces commensales du tractus gastro-intestinal de l'homme et de nombreuses espèces animales. Chez l'homme, le portage digestif asymptomatique des streptocoques du complexe *bovis/equinus* est estimé à 20 % chez les nouveau-nés et à 5 % chez les adultes. L'espèce la plus fréquente est *S. lutetiensis*. *S. alactolyticus* et *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* semblent posséder des habitats plus restreints et sont généralement isolés respectivement d'animaux et de produits alimentaires fermentés. En médecine humaine, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* est l'espèce la plus fréquemment associée à des pathologies infectieuses, sauf en Asie où *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* prédomine. Chez les ruminants, les streptocoques du complexe *bovis/equinus* sont principalement associés à des troubles digestifs et des mammites. Ils peuvent se comporter comme des pathogènes opportunistes responsables de bactériémies chez les mammifères, les marsupiaux et les oiseaux.

La relation entre les streptocoques du complexe *bovis/equinus* et la pathologie infectieuse humaine date de la première description d'endocardite infectieuse à *S. bovis* en 1948. Les streptocoques du complexe *bovis/equinus* font partie des principaux agents responsables d'endocardite infectieuse.

Streptocoques d'origine animale

Ces streptocoques sont pathogènes chez les animaux et occasionnellement responsables d'infections chez l'homme (zoonoses), souvent à la suite d'un contact contaminant avec l'animal source de l'infection. Les infections chez l'homme sont donc rares. Ces streptocoques sont le plus souvent β-hémolytiques, sauf *S. suis* dont l'hémolyse est variable (certaines souches sont β-hémolytiques sur sang de cheval mais toutes les souches sont α-hémolytiques sur sang de mouton).

- *S. canis* a été décrit chez le chien en tant que streptocoque β-hémolytique qui a l'antigène de Lancefield du groupe G. La négativité du test de détection rapide de la pyrrolidonyl arylamidase permet de distinguer *S. canis* de *S. pyogenes*.
- *Streptococcus porcinus* et *Streptococcus pseudoporcinus* : les souches d'origine animale agglutinent le plus souvent avec les antisérums des groupes de Lancefield E, P, U ou V ou sont non groupables. Depuis quelques années, un nombre croissant de souches de *S. porcinus* sont isolées de prélèvements génito-urinaires de patientes. La plupart de ces souches donnent des réactions croisées avec l'antigène de Lancefield du groupe B, ce qui peut être source d'erreur d'identification avec *S. agalactiae* (voir Fig. 28.11). Cependant, *S. porcinus* diffère macroscopiquement de *S. agalactiae* par un aspect plus étalé des colonies et une large zone d'hémolyse de type β autour des colonies. De plus, *S. porcinus* hydrolyse l'esculine, le mannitol et le sorbitol, alors que ces trois tests sont négatifs pour *S. agalactiae* (voir Tableau 28.6). *S. pseudoporcinus* et *S. porcinus* ont des caractères phénotypiques et biochimiques similaires. Ces deux espèces peuvent être différenciées par séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S ou d'un autre gène d'intérêt taxonomique. Il semble que, mis à part les rares cas de personnes en contact avec des porcs, la majorité des souches isolées chez la femme appartiennent à l'espèce *S. pseudoporcinus*.
- *Streptococcus suis,* décrit chez le porc, est responsable chez le jeune animal d'infections invasives graves. La contamination de l'homme se fait soit par contact direct avec un animal infecté par l'intermédiaire de lésions cutanées minimes, soit par ingestion de viande de porc insuffisamment cuite. Chez l'homme, *S. suis* est principalement responsable de méningites purulentes. Phénotypiquement, *S. suis* ressemble aux streptocoques oraux du groupe *mitis* et donc à *S. pneumoniae*. À la différence du pneumocoque, *S. suis* est résistant à l'optochine. L'isolement d'un streptocoque α-hémolytique résistant à l'optochine à partir d'un liquide céphalorachidien est donc évocateur de *S. suis*. La plupart des souches ont les antigènes des groupes R, S ou T de la classification de Lancefield. Certaines souches possèdent un acide lipotéichoïque de paroi et peuvent présenter une réactivité faible avec l'antisérum de groupe D. La virulence de *S. suis* résulte notamment de la présence d'une capsule. La capsule est antigénique et provoque la production d'anticorps spécifiques. Parmi les 35 sérotypes capsulaires de *S. suis* actuellement décrits, le sérotype 2 est le plus virulent et le plus fréquent chez l'homme.
- *Streptococcus equi* comprend trois sous-espèces : *S. equi* subsp. *equi*, *S. equi* subsp. *ruminatorum* et *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. Toutes les souches sont β-hémolytiques et ont l'antigène de Lancefield du groupe C (voir Fig. 28.11). La distinction entre *S. equi* subsp. *ruminatorum* et *S. equi* subsp. *zooepidemicus* est difficile, aussi bien sur le plan phénotypique que sur le plan moléculaire. *S. equi* subsp. *equi* est responsable de la gourme des équidés. *S. equi* subsp. *ruminatorum* et *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, responsables de mammites chez les ruminants, sont occasionnellement responsables d'infections chez l'homme : bactériémie associée ou non à un syndrome de choc toxique streptococcique, pneumonie, infection ostéoarticulaire, endocardite

et méningite. La contamination de l'homme se fait par inhalation, inoculation ou ingestion de produits laitiers mal pasteurisés.

- *Streptococcus iniae* est pathogène pour les poissons et peut être responsable chez l'homme de dermo-hypodermite nécrosante, de bactériémie associée ou non à un SCTS, de pneumonie et d'ostéomyélite. Du fait de leurs habitudes culinaires et de la consommation de poisson cru, les populations asiatiques sont davantage exposées à cette infection. *S. shiloi*, tout d'abord différencié de *S. iniae* par ses caractères phénotypiques, a ensuite été reclassé avec cette espèce. *S. iniae* se présente comme un streptocoque β-hémolytique qui n'agglutine pas avec les antisérums de recherche des antigènes de Lancefield A à G, ce qui doit conduire à la mise en œuvre de tests d'identification complémentaires. Cette espèce n'est pas dans les banques de données des galeries biochimiques d'identification. Son identification est facile par séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S.

Le genre *Enterococcus*

Identification

Le genre *Enterococcus* comprend actuellement 54 espèces (janvier 2016). Les principales espèces isolées chez l'homme sont *E. faecalis*, espèce type, et *E. faecium*. Les entérocoques sont définis par une coloration de Gram positive, un aspect ovoïde des cocci et une disposition préférentielle par paires ou courtes chaînettes après 18 heures de culture en milieu liquide. Ils se distinguent des streptocoques par leur croissance sur gélose ordinaire et dans des conditions hostiles : à 10 °C et à 45 °C, en milieu hypersalé, en présence de 40 % de bile et à pH 9,6. Ils hydrolysent l'esculine en noircissant le milieu bile-esculine. La plupart des espèces produisent une pyrrolidonyl arylamidase et portent l'antigène de groupe D de la classification de Lancefield. Sur gélose au sang, les colonies sont le plus souvent larges (0,5 à 1,5 mm), blanches ou gris-blanc et non hémolytiques (Fig. 28.20). L'identification est fondée sur l'étude des caractères culturaux, biochimiques et antigéniques (Tableau 28.10). *E. faecalis* est caractérisé par sa résistance au tellurite de potassium.



Fig. 28.20 Colonies d'*Enterococcus faecalis* sur gélose au sang.

Tableau 28.10 **Caractères d'identification des principales espèces d'entérocoques.**

	E. faecalis	*E. faecium*	*E. gallinarum*	*E. casseliflavus*	*E. mundtii*	*E. durans*	*E. hirae*	*E. avium*	*E. raffinosus*
Mobilité	–	–	+	+	–	–	–	–	–
Pigmentation jaune	–	–	–	+	+	–	–	–	–
Résistance au tellurite de potassium	+	–	–	–	V	–	–	–	–
Production d'acétoïne	+	+	V	V	+	+	+	V	V
Hydrolyse de l'arginine	+	+	+	V	+	+	+	–	–
Fermentation du									
– Mannitol	+	+	+	+	+	–	–	+	+
– Sorbitol	+	–	–	V	V	–	–	+	+
– Arabinose	–	+	+	+	+	–	–	+	+
– Raffinose	–	–	+	V	V	–	V	–	+
– Saccharose	+	+	+	+	+	–	+	V	+
– Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
– Méthyl-α-D-glucopyranoside	–	–	+	+	–	–	–	+	+
– Sorbose	–	–	–	–	–	–	–	+	+

+ : > 85 % de souches positives ; – : < 15 % de souches positives ; V : caractère variable selon les souches.

Habitat et pouvoir pathogène

Les entérocoques font partie de la flore normale de l'intestin de l'homme et des animaux. Ils peuvent, par contamination de voisinage, coloniser la peau, notamment la région périnéale et le vagin. Les entérocoques sont également isolés de l'environnement (eaux et sol). Les entérocoques sont principalement responsables d'infections urinaires, d'infections intra-abdominales, de suppurations diverses (survenant après une exploration digestive, urologique, etc.). Le caractère polymicrobien de ces infections est fréquent (entérobactéries et bactéries anaérobies). Les entérocoques peuvent également être à l'origine de bactériémies et d'endocardites. Ils peuvent être sélectionnés par certains traitements antibiotiques (céphalosporines de 3e génération et quinolones).

Genres *Abiotrophia, Granulicatella* et *Globicatella*

Ces genres ont été séparés du genre *Streptococcus* du fait de leur distance génétique au niveau de l'ARN 16S. Ces genres ont en commun avec les streptocoques d'être des cocci à Gram positif disposés en paires ou en chaînette, ovoïdes ou pseudobacillaires. Ils sont catalase négative et homofermentaires. Leur croissance se fait par satellitisme ou sur milieux supplémentés en facteur de croissance. Ils produisent une pyrrolidonyl arylamidase. Les deux espèces les plus fréquentes sont *A. defectiva* et *G. adiacens*. Ces germes sont responsables chez l'homme d'infections invasives, souvent persistantes, telles que des endocardites ou des infections osseuses.

Résistance aux antibiotiques des streptocoques et entérocoques β-lactamines résistants

Les streptocoques sont naturellement sensibles aux β-lactamines, à l'exception des monobactames actifs uniquement sur les bactéries à Gram négatif. Les streptocoques β-hémolytiques, comme *S. pyogenes* et *S. dysgalactiae,* sont très sensibles aux pénicillines. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des pénicillines G (benzylpénicilline) et A (amoxicilline) sont inférieures ou égales à 0,01 mg/l. Les CMI pour *S. agalactiae* sont habituellement plus élevées (CMI médiane ou modale = 0,06 mg/l). La résistance acquise liée à la modification des protéines liant les pénicillines (PLP) par transformation et par recombinaison homologue entre espèces proches est fréquente chez les streptocoques oraux, en particulier chez *S. pneumoniae* et les streptocoques du groupe *mitis*. Elle entraîne une résistance croisée à l'ensemble des β-lactamines et l'activité des molécules utilisées en thérapeutique (amoxicilline, ceftriaxone, céfotaxime ou imipénème le plus souvent) doit être confirmée par la mesure des CMI. En cas d'infection invasive, les CMI des β-lactamines doivent être faites à titre systématique pour le pneumocoque, quelle que soit la valeur du test de *screening* par le disque d'oxacilline. Les CMI peuvent être déterminées par utilisation de bandelettes de plastique imbibées d'un gradient d'antibiotiques. La résistance aux β-lactamines n'a en revanche pas été décrite chez les streptocoques pyogènes, à l'exception de *S. agalactiae*. Encore très rares (<2 %), quelques souches tolérantes ou de sensibilité diminuée ont été décrites en Asie et aux États-Unis. Cependant, la signification clinique de cette diminution de sensibilité n'a pas été clairement établie dans la mesure où ces souches n'ont pas été associées à des échecs thérapeutiques. Cette diminution de sensibilité à certaines β-lactamines a été corrélée à des mutations ponctuelles des protéines liant les pénicillines, entraînant une modification de l'affinité des antibiotiques pour leur cible. Aucune souche productrice de bêta-lactamase n'a été décrite chez les streptocoques et apparentés.

Les entérocoques sont naturellement plus résistants aux antibiotiques, notamment aux β-lactamines, que les streptocoques. La présence d'une PLP5 de faible affinité pour les β-lactamines entraîne une résistance aux céphalosporines et une augmentation des valeurs de CMI des pénicillines d'un facteur 10 à 100 par rapport aux CMI de ces antibiotiques pour les streptocoques. En pratique, l'ampicilline ou l'amoxicilline constituent des molécules de choix pour le traitement des infections à *E. faecalis*. En revanche, les souches d'*E. faecium* sont fréquemment résistantes à l'amoxicilline par modification de la PLP5.

Aminosides

Les streptocoques et les entérocoques, du fait de leur métabolisme anaérobie et du caractère incomplet de leur chaîne respiratoire, sont naturellement résistants à bas niveau aux aminosides par défaut de transport actif de l'antibiotique. En l'absence de mécanisme acquis conférant une résistance à haut niveau, l'association avec les antibiotiques actifs sur la synthèse de la paroi (β-lactamines et glycopeptides) est synergique et augmente l'effet bactéricide. La résistance acquise repose sur deux mécanismes principaux, des mutations chromosomiques de la sous-unité 30S du ribosome, cible des aminosides, qui affectent en particulier la sensibilité à la streptomycine et concernent près de 20 % des streptocoques, et l'acquisition par transfert horizontal de gènes codant pour des enzymes inactivatrices des aminosides. La résistance à haut niveau à l'amikacine rapportée chez 10 à 20 % des streptocoques est liée au déterminant génétique *aph3′* codant pour une phosphotransférase. La résistance à haut niveau à la gentamicine, liée principalement au déterminant *aac(6′)-aph(2″)*, codant pour une enzyme bifonctionnelle à activité acétyltransférase et phosphotransférase, confère une résistance à haut niveau à l'ensemble des aminosides, à l'exception de la streptomycine. Ce phénotype de résistance demeure exceptionnel chez les streptocoques.

Macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS)

Les streptocoques sont naturellement sensibles aux macrolides, lincosamides et streptogramines (MLS). Cependant, de nombreux mécanismes de résistance acquise, de fréquence variable en fonction des espèces et de l'origine géographique des souches, sont décrits. La résistance aux macrolides concerne plus de 20 % des souches de streptocoques pyogènes en Europe et plus de 50 % des souches du complexe *bovis/equinus*. Il existe trois principaux phénotypes

reflétant ces mécanismes de résistance. Le phénotype M est caractérisé par une résistance isolée aux macrolides à 14 et 15 atomes de carbone, dont le chef de file est l'érythromycine. Il épargne les macrolides à 16 atomes de carbone, tels que la josamycine, la spiramycine et la midécamycine. Il est dû à un efflux par une pompe à proton et le plus souvent lié à l'acquisition du déterminant génétique *mef*(A). Plus de 80 % des souches résistantes présentent un phénotype MLS_B, d'expression inductible ou constitutive, qui confère une résistance à l'ensemble des macrolides et des lincosamides, ainsi qu'aux streptogramines B. Il est lié à une modification de la cible des antibiotiques par méthylation de l'ARN ribosomique 23S par différentes enzymes codées par les gènes *erm*. Dans ce cas, l'activité de la télithromycine ne peut pas être déduite et doit être testée séparément. Le phénotype L, plus rare, touche uniquement la lincomycine ; les macrolides et la clindamycine conservent leur activité. Il est lié à des enzymes inactivatrices de la lincomycine, les lincosamide nucléotidyl-transférases, codées par les gènes *lnu*, et a été essentiellement décrit chez les espèces *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. suis* et *S. uberis*.

E. faecalis présente une résistance naturelle aux lincosamides et aux streptogramines du fait d'une résistance au facteur A de la streptogramine (phénotype LS_A), ce qui constitue une aide à l'identification de cette espèce. Ce type de résistance naturelle est également présent pour d'autres espèces d'entérocoques : *E. avium*, *E. gallinarum* et *E. casseliflavus*. En revanche, *E. faecium*, *E. durans* et *E. hirae* sont sensibles aux lincosamides et aux streptogramines A. Des résistances acquises similaires à celles observées pour les streptocoques peuvent être observées.

Autres antibiotiques

La résistance acquise aux tétracyclines est fréquente, principalement par acquisition d'une protéine de protection ribosomique codée par le gène *tet*(M). Elle concerne notamment près de 90 % des souches de *S. agalactiae* et 70 % des souches du complexe *bovis/equinus*. La résistance est généralement croisée avec toutes les tétracyclines, à l'exception de la tigécycline pour laquelle aucune souche résistante n'a encore été rapportée. La rifampicine peut être active, mais elle ne doit pas être utilisée seule du fait de la rapidité de sélection de mutants résistants. Des mutations chromosomiques sur la région QRDR (*quinolone resistance determining region*) des topo-isomérases de l'ADN peuvent également être responsables de la résistance aux fluoroquinolones actives sur les streptocoques (lévofloxacine et moxifloxacine), mais elles concernent moins de 2 % des streptocoques. Les streptocoques et les entérocoques sont le plus souvent sensibles au linézolide, à la daptomycine, à la vancomycine et à la teicoplanine. Deux isolats de *S. agalactiae* résistants à la vancomycine ont été décrits. Ces souches isolées d'infections invasives de l'adulte étaient résistantes à la vancomycine après acquisition du déterminant génétique *vanG* et modification du précurseur du peptidoglycane par un mécanisme similaire à celui conférant la résistance aux glycopeptides chez les entérocoques. Pour les entérocoques, la résistance aux glycopeptides peut être naturelle (résistance à la vancomycine de bas niveau pour *E. gallinarum* et *E. casseliflavus* du fait du déterminant génétique *vanC*) ou acquise, notamment les phénotypes VanA et VanB. Les souches de type VanA sont hautement résistantes, de façon inductible, à la vancomycine et à la teicoplanine, alors que les souches de type VanB résistent de manière inductible et à des niveaux variables à la vancomycine seulement. En France, la proportion de la résistance acquise à la vancomycine chez les entérocoques est stable et estimée à moins de 2 %. Des épidémies à *E. faecium* ou *E. faecalis*, le plus souvent de type VanA, ont été rapportées.

Démarche diagnostique

Prélèvements et transport

Prélèvement des échantillons cliniques

Le prélèvement de gorge doit être réalisé avec précaution sous contrôle visuel (abaisse-langue et éclairage adapté) à l'aide d'un écouvillon en coton ou synthétique (type alginate). Après avoir éliminé au maximum les contaminations salivaires, il faut abaisser la langue (non tirée) afin de bien visualiser l'oropharynx et les amygdales. Ensuite, l'écouvillon doit être frotté sur le pharynx, les amygdales et les lésions pultacées en évitant de toucher la langue ou la luette. Pour les prélèvements cutanés, les croûtes des pustules ou le chapeau des vésicules doivent être retirés stérilement avant de frotter fermement l'écouvillon sur la lésion (ce qui peut être douloureux pour le patient). Les prélèvements de plaie seront réalisés de la même manière, après avoir éliminé la flore superficielle contaminante à l'aide d'une compresse imprégnée d'eau ou de sérum physiologique stériles. Si la vésicule est fermée et contient du liquide, ou en cas de cellulite, le liquide inflammatoire est aspiré à l'aide d'une aiguille fine ou d'une seringue après asepsie rigoureuse. Le liquide inflammatoire, lorsqu'il est présent en très petite quantité, peut être repris avec du sérum physiologique stérile. Les autres prélèvements (LCR, hémoculture, urine, etc.) ne nécessitent pas de précautions particulières en dehors du respect des procédures de prélèvements recommandées par le laboratoire.

Transport des prélèvements

Les streptocoques supportent assez bien la dessiccation mais il est préférable d'acheminer le prélèvement au laboratoire le plus rapidement possible avec un délai ne dépassant pas 2 heures. Si un délai d'acheminement du prélèvement supérieur à 2 heures est prévisible, celui-ci doit être placé dans un milieu de transport ou dans un flacon d'hémoculture pour les liquides de ponction. La qualité de l'examen microscopique sera toutefois compromise en cas de délai prolongé avant sa réalisation ou de passage en milieu de transport.

Conservation et transport des souches

Les streptocoques se conservent à −80 °C en bouillon BHI additionné de 15 à 20 % de glycérol pour des durées de plusieurs mois. La conservation des souches de streptocoques doit être effectuée sur une culture récente.

Diagnostic rapide directement à partir du prélèvement

Des trousses commerciales sont développées pour la détection d'antigènes ou d'ADN bactérien directement sur le

prélèvement biologique. La suppression de l'étape de culture permet ainsi de réduire le délai de diagnostic et d'administration d'un traitement approprié. Pour le diagnostic de l'angine à *S. pyogenes*, des tests de diagnostic rapide (TDR) sont commercialisés afin de rendre accessible le diagnostic au lit du patient. Le principe des TDR repose sur la détection directe du polyoside C de *S. pyogenes* à partir d'un écouvillonnage pharyngé par une technique d'immunochromatographie. Le temps global de réalisation d'un TDR varie de 5 à 7 minutes. Plusieurs TDR sont commercialisés, mais leurs performances en termes de sensibilité et de spécificité sont variables. Les performances annoncées, évaluées par rapport à la culture sur gélose au sang incubée 48 heures en anaérobiose, sont les suivantes : sensibilité > 90 %, spécificité > 95 %, valeur prédictive positive > 90 %, valeur prédictive négative > 96 %. La plupart des TDR permettent la détection de *S. pyogenes* à une concentration de 10^6 UFC/ml. Outre ces différences de performances intrinsèques, des variations inhérentes à l'opérateur ont également été démontrées. Un test immunochromatographique pour la détection du polyoside C spécifique de *S. pneumoniae* a également été développé. Ce test est validé sur le LCR en cas de suspicion de méningite ou sur les urines. Quelques publications font état de son utilisation sur le liquide pleural, mais des cas de faux positifs ont été rapportés en cas de suspicion de pleurésie ou pleuropneumopathie. La recherche d'antigène de *S. pneumoniae* sur les urines pédiatriques n'est pas contributive car les enfants sont fréquemment colonisés par du pneumocoque au niveau du rhinopharynx et peuvent donc éliminer dans les urines des antigènes pneumococciques en dehors de toute infection. La sensibilité du test Binax NOW® *Streptococcus pneumoniae* (Alere) dans les urines varie de 80 à 90 % et la spécificité de 76 à 97 % selon les études. L'utilisation des tests d'agglutination au latex n'est plus recommandée pour orienter l'étiologie d'une méningite bactérienne (17e conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse : les méningites purulentes communautaires, 2009). Récemment, des trousses de PCR en temps réel ont été commercialisées pour la détection de la colonisation vaginale per partum de *S. agalactiae* (GeneOhm™ StrepB, BD et Xpert® GBS, Cepheid). Ces trousses présentent l'avantage de fournir un résultat en 1 heure avec une sensibilité de 92 à 94 % et une spécificité de 96 % comparativement à la culture. Des trousses de PCR multiplex se développent actuellement pour une approche syndromique en cas de méningite ou de pneumonie, incluant le pneumocoque parmi les bactéries recherchées.

Examen microscopique direct

Un examen cytobactériologique, avant coloration, est réalisé sur des échantillons de LCR, d'urines, d'épanchement liquidien pleural, péritonéal, articulaire ou à partir des cultures positives en milieu liquide (flacons d'hémocultures, bouillon d'enrichissement). L'observation à l'état frais révélera alors la présence d'éléments sphériques ou coccoïdes immobiles et asporulés, de diamètre inférieur à 2 μm, regroupés en diplocoques ou en chaînettes de longueur variable. En parallèle, des frottis des échantillons prélevés sont réalisés et colorés. Ils permettent d'observer la présence de cellules (polynucléaires neutrophiles et/ou cellules épithéliales) et de bactéries dont on apprécie l'abondance, l'aspect et la localisation intracellulaire éventuelle. La présence de cocci à Gram positif disposés en diplocoques ou en chaînettes plus ou moins longues évoque les streptocoques ou les entérocoques (voir Fig. 28.8, 28.12 et 28.17). Cet examen direct oriente le diagnostic étiologique et permet le choix de milieux de culture enrichis et de milieux sélectifs en cas d'une flore polymorphe associée.

Isolement et cultures

Milieux de culture

À la différence des entérocoques, les streptocoques sont des bactéries relativement exigeantes sur le plan nutritif, se développant sur des milieux gélosés enrichis tels que les milieux Columbia au sang. Tous les milieux d'isolement contiennent du sang défibriné dont l'origine peut être différente selon les fabricants (mouton, cheval). Certains auteurs recommandent d'utiliser un milieu au sang de cheval qui permettrait une meilleure expression de l'hémolyse. La concentration en sang pouvant modifier l'expression et la qualité de l'hémolyse, une concentration de 5 % est donc recommandée. Certaines espèces sont sensibles aux variations de pH et nécessitent donc d'être cultivées dans des milieux tamponnés comme le bouillon glucosé tamponné ou le bouillon Todd-Hewitt. Pour améliorer la croissance des souches d'*Abiotrophia* et de *Granulicatella*, du chlorhydrate de pyridoxal (100 μg/ml) doit être additionné sur la gélose Columbia au sang de mouton. Il est parfois nécessaire d'avoir recours à des milieux sélectifs pour éliminer une flore associée non pathogène ou une flore altérant les caractéristiques culturales des streptocoques. Ainsi, le milieu ANC (type Columbia additionné d'acide nalidixique et de colimycine) inhibe la croissance des bactéries à Gram négatif et le milieu à l'azide de sodium et au cristal violet inhibe la croissance des bactéries à Gram négatif et des staphylocoques.

Des milieux pour la détection spécifique de *S. agalactiae* ont également été développés : le milieu Granada et des milieux chromogènes. Le milieu Granada favorise l'expression du pigment orangé voire rouge brique dénommé granadène ou β-hémolysine produit par *S. agalactiae* après 48 heures d'incubation en anaérobiose. Le milieu Granada permet l'identification directe des colonies de couleur orange de *S. agalactiae*, à l'exception des souches non hémolytiques et non pigmentées, qui représentent environ 5 % des souches responsables d'infections invasives (voir Fig. 28.14). Les milieux chromogènes présentent l'avantage d'identifier de façon présomptive toutes les souches de *S. agalactiae* après 24 heures d'incubation en atmosphère aérobie (quel que soit leur caractère pigmenté). Néanmoins, cette identification présomptive doit être confirmée par agglutination de l'antigène de Lancefield.

Les bouillons d'enrichissement (Todd-Hewitt ou BHI) sont ensemencés avec le prélèvement et incubés une nuit à 37 °C. Pour la culture des *Abiotrophia* et *Granulicatella*, le bouillon doit être additionné de chlorhydrate de pyridoxal (10 μg/ml) ou de cystéine (100 μg/ml). L'isolement sera fait le lendemain sur un milieu sélectif pour les streptocoques afin d'éliminer les contaminants éventuellement présents.

Les streptocoques et les entérocoques ont un métabolisme anaérobie mais la plupart tolèrent l'O_2 et peuvent être cultivés en aérobiose in vitro. La croissance et l'expression du caractère hémolytique sont favorisées par une atmosphère enrichie en CO_2 ou en anaérobiose à une température optimale de 35 à 37 °C.

Cultures et qualité de l'hémolyse

Après 24 heures d'incubation à 37 °C sur une gélose au sang, les streptocoques se présentent sous la forme de colonies rondes à bords nets, convexes, pouvant être entourées d'une zone hémolytique dont il existe trois aspects différents. Les colonies β-hémolytiques sont entourées d'une zone claire à bords nets correspondant à une hémolyse totale dont le diamètre est variable selon les espèces (voir Fig. 28.9 et 28.13). Les colonies α-hémolytiques (ou *viridans*) sont entourées d'une zone verdâtre à bords mal limités, due à une dégradation incomplète de l'hémoglobine (voir Fig. 28.10). Le diamètre de la zone d'hémolyse α est en général plus petit que le diamètre d'hémolyse β. Enfin, certaines espèces de streptocoques ne présentent aucune hémolyse sur gélose au sang; on parle de streptocoques non hémolytiques. La morphologie et la taille des colonies sont variables selon les espèces. Les colonies de *S. pyogenes* et de *S. dysgalactiae* ont un diamètre d'environ 0,5 µm; elles présentent une morphologie sphérique et bombée, un aspect blanchâtre ou translucide et sont entourées d'une large zone de β-hémolyse (voir Fig. 28.9). Les colonies de *S. agalactiae* ont un diamètre d'environ 1 à 2 µm, leur morphologie est bombée et leur couleur grisâtre. Les colonies de *S. agalactiae* sont entourées d'une zone de β-hémolyse très réduite voire absente (voir Fig. 28.13). Certaines souches de *S. agalactiae* apparaissent sous forme de colonies de couleur orange-saumon lorsqu'elles sont incubées en anaérobiose. Les streptocoques oraux forment des colonies punctiformes de 0,1 à 0,5 µm de diamètre, souvent entourées d'une α-hémolyse (voir Fig. 28.10). Les entérocoques forment des colonies blanches le plus souvent non hémolytiques sur gélose au sang (voir Fig. 28.20). Ils cultivent également sur les milieux non enrichis (géloses ordinaires).

En milieu liquide, la croissance des streptocoques peut s'accompagner d'un trouble homogène avec ou sans dépôt pour *S. agalactiae*, alors qu'elle est granuleuse avec un surnageant limpide pour *S. pyogenes*, *S. dysgalactiae*, *S. pneumoniae* et certains autres streptocoques oraux. Les morphologies caractéristiques des différents genres (diplocoques, chaînettes plus ou moins longues ou groupements en tétrades et amas) sont observées à partir d'une culture en milieu liquide.

Tests d'identification

Détermination de l'antigène du groupe de Lancefield (sérogroupage) et sérotypage

La classification de Lancefield repose sur les caractères antigéniques des polyosides de la paroi. Le « polyoside C » permet la caractérisation antigénique des streptocoques β-hémolytiques des groupes A, B, C, F et G par une technique rapide d'agglutination sur lame (voir Fig. 28.11). Différents kits sont commercialisés afin de déterminer le sérogroupe des principaux streptocoques rencontrés en pathologie humaine (A, B, C, D, F et G). La détection de l'antigène de groupe D des streptocoques du complexe *S. bovis*/*S. equinus* et des entérocoques est inconstante. La comparaison des différents kits a montré qu'il existe des réactions croisées entre certaines espèces de streptocoques (notamment entre les streptocoques du groupe C et les pneumocoques) et des réactions faussement négatives.

L'existence d'une capsule ou la présence de résidus polyosidiques à la surface de la paroi bactérienne ont permis l'établissement d'une classification sérologique (sérotypage) pour *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* et *S. suis*.

Tests d'orientation

L'identification des streptocoques et des entérocoques repose sur la mise en évidence d'un ensemble de caractères physiologiques et biochimiques.

Recherche de la pyrrolidonyl arylamidase (PYR)

S. pyogenes, les abiotrophes et les entérocoques possèdent une pyrrolidonyl arylamidase dont le principal substrat est le L-pyrrolidonyl-β-naphtylamide (PYR). L'hydrolyse du PYR libère la β-naphthylamine qui peut être détectée par le N,N-diméthylaminocinnamaldéhyde. Ces réactifs, commercialisés sous forme de kit, permettent en quelques minutes d'identifier une souche de streptocoque β-hémolytique comme *S. pyogenes*, de différencier une souche d'entérocoque d'une souche de streptocoque du complexe *S. bovis*/*S. equinus* ou d'orienter l'identification de colonies α- ou non hémolytiques de cocci à Gram positif dépourvus de catalase.

Sensibilité à l'optochine et résistance à la vancomycine

L'étude de la sensibilité à l'optochine permet de différencier les pneumocoques (sensibles) des autres streptocoques oraux après incubation en atmosphère enrichie en CO_2 (voir Fig. 28.19).

La résistance à la vancomycine permet d'orienter l'identification vers les espèces des genres *Leuconostoc*, *Pediococcus* ou *Weissella*.

Test de Christie, Atkins, Munch-Petersen (CAMP-test)

Ce test permet d'identifier *S. agalactiae* par la mise en évidence de la production du *CAMP-factor*. Le *CAMP-factor* exacerbe l'activité hémolytique de l'hémolysine sécrétée par *Staphylococcus aureus*. La souche de streptocoque à étudier et la souche de *S. aureus* sont ensemencées en strie sur une gélose au sang perpendiculairement mais sans contact. Un test positif, évocateur de *S. agalactiae*, se manifeste par un élargissement de la zone d'hémolyse à la jonction des deux stries (voir Fig. 28.15).

Test à l'hippurate

Ce test consiste à inoculer le streptocoque à identifier dans un bouillon d'hippurate de sodium à 1 % et d'incuber la suspension 2 heures à 37 °C. La réaction est révélée après l'ajout de ninhydrine et une seconde incubation de 15 minutes à 37 °C. L'apparition d'une couleur violacée du bouillon est en faveur de *S. agalactiae*.

Tests de résistance à la bile et d'hydrolyse de l'esculine

Ce test permet essentiellement de reconnaître les streptocoques du complexe *S. bovis/S. equinus* et les entérocoques. L'obtention d'une culture sur milieu bile-esculine avec noircissement de la gélose met en évidence la positivité du test.

Tolérance au milieu hypersalé (NaCl à 6,5 %)

L'aptitude d'une souche de streptocoque à se développer sur milieu hypersalé (6,5 % de NaCl) permet essentiellement de différencier les entérocoques des streptocoques du complexe *S. bovis/S. equinus*. La plupart des entérocoques se développent facilement en 24 heures sur milieu hypersalé.

Identification et épidémiologie moléculaire

L'identification des streptocoques et des entérocoques repose sur un ensemble de caractères phénotypiques et antigéniques auxquels s'ajoutent des caractères biochimiques (voir Tableau 28.5). Outre les tests individuels d'orientation cités ci-dessus, l'identification de la plupart des streptocoques est réalisable à l'aide de galeries et de systèmes automatisés (Api® 20 Strep et rapid ID32 Strep, bioMérieux; TAXiden®STREP, I2A; RapID™ STR, Remel; Vitek2®, bioMérieux; BD Phoenix™). L'identification à l'aide de galeries manuelles ou automatisées est fondée sur un panel de tests enzymatiques et de fermentations nécessitant une incubation de 4 à 18 heures. L'identification phénotypique est parfois compliquée par la variabilité des réactions métaboliques des souches au sein d'une même espèce, par l'expression inconstante d'un caractère donné pour une même souche testée de façon itérative ou par la similitude des profils biochimiques de souches appartenant à des espèces proches phylogénétiquement. Ces limites peuvent imposer la réalisation d'analyses complémentaires telles que l'étude du profil protéique (spectrométrie de masse MALDI-TOF), l'utilisation de sondes oligonucléotidiques spécifiques ou le séquençage du gène de la superoxyde dismutase.

Dans le cadre d'études épidémiologiques, les souches de *S. pyogenes* ou de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* de même génotype *emm* peuvent être comparées par électrophorèse en champ pulsé. La comparaison des souches de *S. agalactiae* s'effectue par MLST. Pour les autres espèces, l'amplification enzymatique aléatoire (RAPD) peut aussi être utilisée pour différencier des souches. Le développement d'outils bio-informatiques associée à la démocratisation du séquençage des génomes complets devraient bientôt permettre une comparaison très fine des génomes bactériens entre eux.

Antibiogramme

L'antibiogramme est à réaliser selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST (www.sfm-microbiologie.org). La détermination de la sensibilité aux antibiotiques des streptocoques, par la technique de diffusion, doit être réalisée sur gélose MH-F additionnée de 5 % de sang de cheval défibriné mécaniquement et de 20 mg/l de β-nicotinamide adénine dinucléotide (β-NAD) (Fig. 28.21). Pour les entérocoques, une gélose de Mueller-Hinton simple est recommandée (Fig. 28.22). Après 16 à 24 heures d'incubation, la lecture des diamètres d'inhibition et l'interprétation des profils de résistance sont réalisées selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST. Pour les streptocoques β-hémolytiques sur gélose MH-F, ne pas lire le diamètre de la zone d'hémolyse mais la zone d'inhibition. Il est à noter que la sensibilité apparente d'une souche de croissance lente n'est pas toujours corrélée à l'efficacité de l'antibiotique in vivo et la signification des larges zones d'inhibition sur l'antibiogramme doit être interprétée avec réserve. En l'absence de recommandations du CA-SFM pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques des abiotrophes, le CNR des streptocoques préconise de réaliser l'antibiogramme sur gélose Columbia additionnée de 5 % de sang de mouton et de 100 μg/ml de chlorhydrate de pyridoxal.

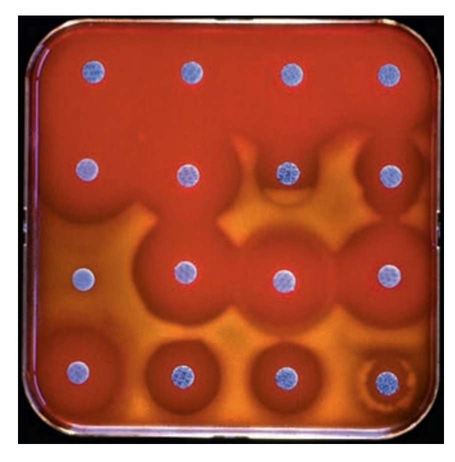


Fig. 28.21 **Antibiogramme de *Streptococcus pyogenes*.**

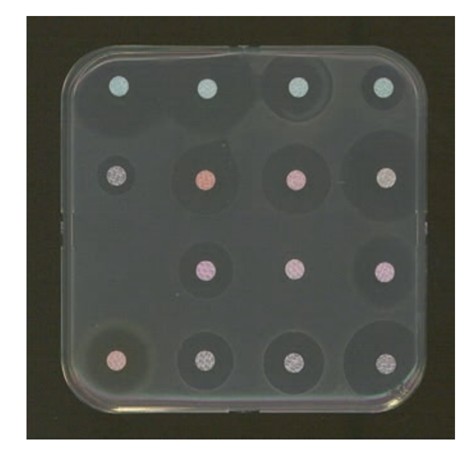


Fig. 28.22 **Antibiogramme d'*Enterococcus faecalis*.**

Diagnostic sérologique

Infections à streptocoque du groupe A

Les anticorps spécifiques dirigés contre les enzymes produites par *S. pyogenes* sont recherchés devant un tableau clinique évocateur d'une affection poststreptococcique non suppurative : rhumatisme articulaire aigu ou glomérulonéphrite aiguë. Différents kits de diagnostic peuvent être utilisés pour rechercher les anticorps antistreptolysine O (ASLO), les anticorps antistreptodornase (ASD) et éventuellement les anticorps antistreptokinase (ASK).

L'interprétation de ces recherches d'anticorps peut être délicate du fait de la variation des taux significatifs en fonction de la technique utilisée et d'autres facteurs (âge, saison et zone géographique). Par exemple, les taux d'ASLO et d'ASD de 200 UI/ml chez l'enfant et de 300 Ul/ml chez l'adulte n'ont pas de signification pathologique. Comme dans tout diagnostic sérologique, l'interprétation doit être faite à partir des résultats de deux prélèvements réalisés à 15 jours d'intervalle et doit être comparée à la cinétique théorique d'apparition des anticorps. Il est conseillé de rechercher à la fois les ASLO et les ASD.

Les ASLO apparaissent habituellement 8 à 10 jours après une infection aiguë ; leur maximum (1500 à 2000 UI/ml) est atteint vers la 3e ou 4e semaine. Les ASLO n'augmentent pas lors des infections cutanées car le cholestérol et les β-lipoprotéines tissulaires se lient à la streptolysine O et inhibent la production des anticorps antistreptolysine. Les ASLO peuvent également être augmentés lors d'infections à *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

Les ASD présentent une cinétique légèrement différente. Ils apparaissent vers la 3e semaine, le maximum se situant entre 6 et 8 semaines, et le retour à la normale peut s'étaler sur une année. Ils sont toujours augmentés, tant lors des infections cutanées que lors des infections muqueuses. Leur production n'est inhibée ni par les β-lipoprotéines, ni par le cholestérol.

Le dosage des autres anticorps (antistreptokinase et antihyaluronidase) est d'un intérêt plus limité car leur augmentation est irrégulière ou faible.

Sérologie antipneumococcique

Cette sérologie n'est pas utile pour le diagnostic des infections à pneumocoque, mais peut être demandée pour le suivi de vaccinations chez des patients ayant des déficits immunitaires.

Pour en savoir plus

Bouvet A, Schlegel L, Loubinoux J. Streptococcaceae : Streptococcus, Abiotrophia, Granulicatella, Enterococcus et autres genres apparentés. In : Freney J, Leclercq R, Renaud F, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. 2e éd. Paris : ESKA ; 2007. p. 845–97.

Garnier F, Denis F. Cocci à Gram positif. In : Denis F, Ploy MC, Martin C, et al., editors. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson ; 2007. p. 251–85.

Tazi A, Plainvert C, Bouvet A, et al. Streptococcus et autres genres apparentés. In : Freney J, Leclercq R, Renaud F, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. 3e éd. Paris : ESKA ; 2016.

Cocci à Gram négatif

F. Garnier, M.-C. Ploy, F. Denis

PLAN DU CHAPITRE

Les cocci à Gram négatif aérobies regroupent deux genres : *Neisseria* et *Branhamella*.

Ce sont des cocci à Gram négatif « en grains de café », aérobies stricts, oxydase positif, catalase positif.

Les deux principales espèces de *Neisseria* pathogènes sont *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*. Il existe cependant des porteurs sains de *N. meningitidis*, mais ce n'est pas le cas pour *N. gonorrhoeae*. Les autres espèces de *Neisseria* sont pour la plupart des commensales de l'homme ou des animaux mais peuvent devenir des pathogènes opportunistes.

Branhamella catarrhalis est une bactérie commensale des voies respiratoires supérieures, qui peut être responsable d'infections, notamment respiratoires.

La taxonomie de la famille des *Neisseriaceae* a beaucoup évolué au cours du temps et comprend de nombreux genres en plus de celui des *Neisseria*. *Branhamella catarrhalis* appartient à la famille de *Branhamaceae*.

Habitat, pouvoir pathogène

Parmi les *Neisseria* pathogènes, à côté de *N. meningitidis* et de *N. gonorrhoeae*, on retrouve le plus souvent *N. lactamica* et *N. polysacchareae*.

Le réservoir de *N. meningitidis* (méningocoque) est spécifiquement humain. Il existe en effet 5 à 10 % de porteurs sains au niveau de la paroi postérieure du rhinopharynx. Le taux de colonisation peut même atteindre 40 % des sujets dans certains cas de promiscuité.

Le portage peut être transitoire, intermittent ou persistant (5 à 6 mois). La transmission interhumaine du méningocoque se fait par voie aérienne (gouttelettes de Pflügge).

L'infection méningococcique se développe à partir du nasopharynx où la bactérie vit à l'état commensal. La bactérie peut rester au niveau nasopharyngé, mais elle peut aussi franchir la muqueuse, passer dans le sang (bactériémie), et bien souvent elle franchit ensuite la barrière hématoméningée. L'incubation est de 3 à 10 jours.

Les conditions de pathogénicité sont mal connues. Le passage d'un état commensal à l'état pathogène est probablement le résultat de différents facteurs dont la spécificité d'hôte (déficits en complément, etc.) et la virulence de la souche. Une infection virale respiratoire constitue un facteur favorisant l'infection méningococcique (grippe notamment).

Le méningocoque peut être à l'origine de différentes manifestations cliniques :

- méningite cérébrospinale : le méningocoque a franchi la barrière hématoméningée après un passage dans la circulation générale ;
- purpura fulminans (Fig. 29.1) : il s'agit d'un choc septique d'apparition brutale, d'évolution rapide et très sévère. Le patient présente des lésions purpuriques qui peuvent être discrètes ou très nombreuses. Les purpura fulminans sont plus fréquents avec le sérogroupe C qu'avec le sérogroupe B. Le pronostic du purpura fulminans est amélioré avec la précocité du traitement antibiotique ;
- d'autres formes cliniques moins fréquentes ont été décrites : infections pulmonaires, ostéomyélites, arthrites, cellulites, péricardites, péritonites, endophtalmies. Plus rarement, des infections génitales ont été rapportées chez l'homme et la femme, probablement consécutives à des pratiques orogénitales. Récemment, des épidémies d'urétrites dues à un méningocoque de groupe C (complexe clonal 11) ont été décrites chez des homosexuels (MSM) en Allemagne et en France.
- exceptionnellement, il peut y avoir des infections chroniques à méningocoque accompagnées de faibles bactériémies.

La mortalité globale est de l'ordre de 11 % ; elle est 4 fois plus élevée en présence de purpura.

En France, les infections invasives à méningocoque sont des maladies à déclaration obligatoire. Celle-ci peut être effectuée par le clinicien ou le biologiste. Les critères de déclaration sont définis dans la circulaire de la Direction générale de la santé (n° DGS/5C/2006/458 du 23 octobre 2006 relative à la prophylaxie des infections invasives à méningocoque, mise à jour du 17 mars 2016).

Ces critères de déclaration sont au moins l'un des quatre critères suivants :

- isolement bactériologique de méningocoques ou PCR positive à partir d'un site normalement stérile (sang, L.C.R., liquide articulaire, liquide pleural, liquide péricardique, liquide péritonéal, liquide de la chambre antérieure de l'œil) **ou** à partir d'une lésion cutanée purpurique ;

Bactériologie médicale





Fig. 29.1 Nécrose tissulaire extensive (A) et purpura fulminans (B).

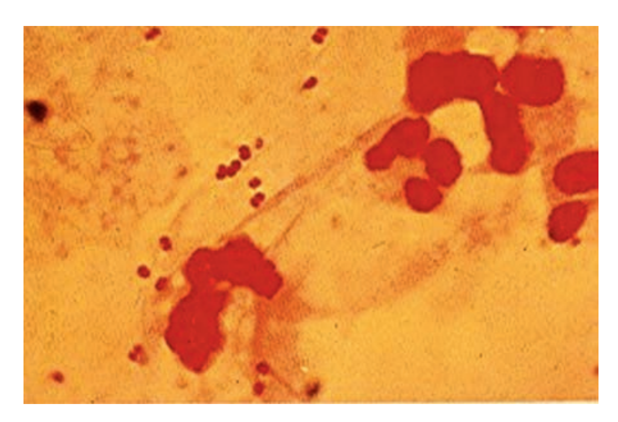


Fig. 29.2 Examen direct après coloration de Gram à partir d'un LCR. Présence de polynucléaires et de diplocoques à Gram négatif (méningite à méningocoque) × 1000.

- présence de diplocoques à Gram négatif à l'examen direct du LCR (Fig. 29.2) ;
- LCR évocateur de méningite bactérienne (à l'exclusion de l'isolement d'une autre bactérie) **et** présence d'éléments purpuriques cutanés quel que soit leur type ;
- présence d'un purpura fulminans (purpura dont les éléments s'étendent rapidement en taille et en nombre, avec au moins un élément nécrotique ou ecchymotique de plus de 3 mm de diamètre associé à un syndrome infectieux sévère, non attribué à une autre étiologie. L'état de choc témoigne de l'extrême gravité de ce syndrome).



Fig. 29.3 Écoulement purulent au niveau du méat urétral, évocateur d'une urétrite gonococcique.

Les méningocoques circulent continuellement dans la population à l'état de portage, et sont à l'origine de cas sporadiques de méningites dus à des sérogroupes variés, avec toutefois une prédominance des sérogroupes B, C, Y et W135 dans les pays industrialisés. En France, en 2014, il y a eu 426 infections méningococciques invasives déclarées. La répartition des sérogroupes (culture + PCR) était la suivante : A : 0 %, B : 56 %, C : 30 %, Y : 10 %, W : 4,5 % et un seul cas pour X. Quand plusieurs cas ont été observés dans un intervalle de moins de 3 mois, on parle alors de cas groupés. En Afrique subsaharienne en revanche, les infections à méningocoque évoluent sur un mode endémo-épidémique avec des bouffées épidémiques régulières en saison sèche, dues surtout aux sérogroupes A et W135.

En 2014, le taux d'incidence en France, corrigé pour la sous-notification, était de 0,72 pour 10^5, taux le plus faible de la décennie, avec une diminution de 27 % par rapport à 2013. Les taux d'incidence les plus élevés ont été observés chez les enfants de moins de 1 an (8,9/100 000) et les 18–20 ans (1,5/100 000 en 2015).

Depuis 2003, il existe une situation hyperendémique d'infections invasives à méningocoque de sérogroupe B en Seine-Maritime avec une incidence de 4/100 000 habitants, avec un purpura fulminans dans 32,7 % des cas. Cette hyperendémicité est surtout marquée dans la zone de Dieppe ; elle est due à une souche de sérogroupe B appartenant au complexe clonal ST2.

Depuis 2012, une augmentation de l'incidence des infections invasives à méningocoque de sérogroupe C a été observée en Île-de-France avec un pic en mars 2014. Cette augmentation a concerné principalement les hommes de 25 à 59 ans ayant des relations sexuelles avec des hommes.

N. gonorrhoeae (gonocoque) est un pathogène obligatoire, responsable de blennorragie. Chez l'homme, les manifestations cliniques sont à type d'urétrite avec dysurie douloureuse et écoulement purulent au niveau du méat urétral (Fig. 29.3). Chez la femme, il s'agit d'une infection endocervicale avec urétrite concomitante dans 70 à 90 % des cas. Cliniquement, on retrouve des leucorrhées parfois sanglantes et plus rarement des douleurs abdominales. La durée d'incubation est de 2 à 7 jours chez l'homme et de 8 à 10 jours chez la femme. La transmission se fait par voie sexuelle. La gonococcie de la femme enceinte peut être responsable d'avortement spontané, de chorioamniotite ou de rupture prématurée des membranes. Le nouveau-né est alors à risque de développer une conjonctivite (Fig. 29.4). Le gonocoque peut aussi être responsable d'infections ascendantes : salpingites, endométrites, abcès ovariens (10 à 20 % des



Fig. 29.4 **Dépistage de conjonctivite à gonocoque chez le nouveau-né.**

cas). Ces infections peuvent avoir des conséquences graves : stérilité ou grossesses extra-utérines à répétition.

Le gonocoque peut aussi être responsable d'infections anorectales et pharyngées ; ces dernières sont souvent asymptomatiques. Dans de très rares cas (1 à 3 %), l'infection peut être disséminée et bactériémique. Les infections à gonocoque en France sont répertoriées par l'Institut national de veille sanitaire (InVS) à travers le réseau RENAGO. Le nombre de souches isolées annuellement est de plusieurs centaines (417 en 2003). Cette infection sexuellement transmissible aurait progressé de 52 % entre 2008 et 2009, et touche annuellement 15 à 20 000 hommes ; les fréquences des formes asymptomatiques chez les femmes rendent difficiles les estimations. Les infections disséminées sont de moins en moins fréquentes (1 à 3 % des malades). Elles se manifestent le plus souvent par des polyarthralgies associées à une dermatite. Sans traitement, cela peut évoluer vers une ou plusieurs arthrites septiques pouvant toucher toutes les articulations. Ces manifestations disséminées peuvent s'accompagner d'endocardites ou de méningites.

Les autres espèces de *Neisseria* font partie de la flore normale du rhinopharynx et de l'appareil urogénital. Elles peuvent être considérées comme pathogènes quand elles sont isolées d'un site normalement stérile, de prélèvements bronchopulmonaires protégés par exemple. À noter que le portage de *N. lactamica*, qui est un commensal du rhinopharynx, entraîne la production d'anticorps protecteurs contre l'infection à méningocoque. Certaines autres *Neisseria* ont été impliquées dans des septicémies, des méningites, des endocardites, des bartholinites, des ostéites, ou encore des endophtalmies.

B. catarrhalis est un hôte des voies respiratoires supérieures et n'a été considéré pendant longtemps que comme un commensal. Cependant, *B. catarrhalis* a été isolé de pus d'otites, de sinusites, de bronchites et de pneumonies. Les infections des voies respiratoires supérieures sont plus fréquentes chez l'enfant et celles des voies inférieures chez l'adulte, surtout chez les personnes âgées et les immunodéprimés. D'autres atteintes ont été décrites, mais sont plus rares (endocardites, septicémies, méningites, infections oculaires, péritonites chez les dialysés, arthrites septiques, etc.).

Diagnostic bactériologique direct

Prélèvements

Pour le diagnostic des infections à méningocoque, les prélèvements seront : liquide céphalorachidien (LCR), hémocultures, lésions purpuriques et sang total et/ou sérum pour une recherche spécifique par PCR. Les lésions purpuriques sont prélevées en injectant une petite quantité de sérum physiologique avec une seringue intradermique ou en écouvillonnant les lésions après scarification. Le prélèvement du nasopharynx est discuté, le méningocoque pouvant être un commensal (Tableau 29.1). D'autres prélèvements peuvent être effectués : liquides péritonéaux, oculaires, articulaires, etc.

Afin de poser le diagnostic d'infection invasive à méningocoque en cas de décès précoce, des prélèvements post mortem peuvent être effectués plusieurs heures après le décès (lésions purpuriques, nasopharynx, ponction intracardiaque, etc.), avec de bonnes chances de mettre le méningocoque en évidence, en culture ou par PCR.

Pour la recherche de gonocoque, les prélèvements sont variés. Les prélèvements à l'écouvillon emploieront des modèles en Dacron®. Chez la femme, le gonocoque peut être recherché au niveau du col utérin (prélèvement d'endocol), des glandes de Bartholin, mais aussi en peropératoire au niveau des trompes et de l'endomètre. Chez les jeunes filles prépubères, la recherche peut se faire au niveau vaginal. Dans les deux sexes, le gonocoque peut être recherché au niveau urétral. D'autres prélèvements peuvent aussi être effectués : nasopharynx, anorectaux, liquides articulaires, lésions cutanées, oculaires, prélèvements gastriques du nouveau-né, etc., mais la présence du gonocoque dans des hémocultures est également possible.

Pour *B. catarrhalis*, les prélèvements seront pratiqués en fonction de la pathologie. Le plus souvent, il s'agira de prélèvements bronchopulmonaires, de préférence protégés, de pus de sinus ou d'oreille.

Transport et stockage

Le méningocoque et le gonocoque sont des germes fragiles, sensibles aux variations de température, à la dessiccation et ne persistant pas dans l'environnement. De plus, ils présentent une autolyse spontanée. Les prélèvements devront être acheminés immédiatement au laboratoire en les protégeant des températures extrêmes, surtout basses. En cas de délai d'acheminement trop long, des milieux de transport pourront être utilisés, notamment pour le gonocoque et le méningocoque.

Manipulation

L'ensemencement au laboratoire devra être immédiat, de préférence sur des milieux préchauffés à 37 °C.

Les manipulations ont lieu dans un poste de sécurité microbiologique à l'aide du matériel stérile adapté. De plus, lors de la réalisation de réactions d'agglutination sur lame, des gants, un masque et des lunettes de protection doivent être portés par le manipulateur.

Tableau 29.1 **Prélèvements et diagnostic bactériologique des infections invasives à *Neisseria meningitidis*.**

	LCR	Hémocultures	Pétéchies	Gorge	Sang total sérum
Examen direct	+++	–	+/–	–	–
Culture	+++	+++	++	+*	–
Recherche Ag de groupe – Agglutination latex (ABCW135XY)	++ si germes à l'examen direct	+ si positives à cocci à Gram négatif en grain de café	–	–	–
Recherche génome *Polymerase chain reaction*	+++	+ si positives à cocci à Gram négatif en grain de café	++	+*	+++

* Sans intérêt, sauf si recherche Ag ou génome + et culture – sur LCR et/ou hémoculture.

Les différentes approches diagnostiques sont résumées dans le tableau 29.1.

Examen direct

En cas de suspicion d'infection invasive à méningocoque, l'examen direct des prélèvements de LCR, des lésions purpuriques doit être réalisé en urgence. L'absence de leucocytes dans le LCR ne doit pas faire écarter une méningite et l'examen direct après coloration de Gram doit être effectué systématiquement, surtout si le clinicien signale une situation grave ; il faut signaler le fait que, dans les méningites cérébrospinales, le LCR est souvent paucimicrobien et l'examen direct doit être très attentif. Un examen direct sera aussi pratiqué sur tout site où le méningocoque n'est pas habituellement commensal. Dans le cas du gonocoque, les examens directs des prélèvements génitaux ou liquides articulaires devront être pratiqués.

Les *Neisseria* sont des cocci à Gram négatif en diplocoques avec fréquemment un aspect caractéristique en « grains de café », mais ils peuvent aussi se présenter en tétrades (voir Fig. 29.2 et 29.5). Les *Neisseria* résistent parfois à la décoloration. Les gonocoques et les méningocoques sont souvent intracellulaires. Certaines *Neisseria* présentent un aspect bacillaire, notamment *N. elongata* (surtout après traitement par la pénicilline) ainsi que l'espèce récemment décrite : *N. bacilliformis*.

Le diagnostic différentiel est parfois difficile avec les bactéries des genres *Moraxella* et *Acinetobacter* qui peuvent apparaître comme des cocci à Gram négatif. On peut alors effectuer une coloration de Gram sur les bactéries isolées à la périphérie de la zone d'inhibition autour d'un disque de pénicilline. Les *Moraxella* et *Acinetobacter* prendront alors un aspect filamenteux ou en massue, alors que les *Neisseria* ou *Branhamella* resteront sphériques.

Milieux de culture

Les gonocoques sont des germes fragiles nécessitant une culture sur milieux riches et la présence de CO_2.

Les autres *Neisseria* et *Branhamella*, y compris *N. meningitidis*, ne sont pas aussi exigeants et peuvent être cultivés à 37 °C sans CO_2 sur gélose au sang ou Mueller-Hinton. Cependant, une atmosphère enrichie en CO_2 est recommandée, notamment pour la primoculture car elle favorise la croissance en 24 heures. Afin d'éviter des contaminations du personnel, les prélèvements seront manipulés sous hotte à flux laminaire.

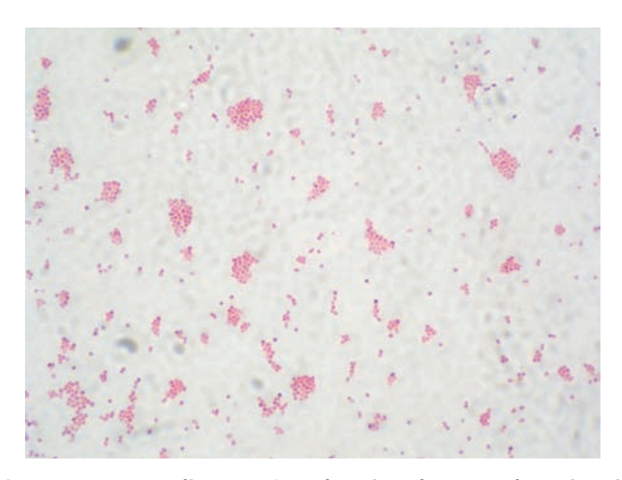


Fig. 29.5 Examen direct après coloration de Gram de *Neisseria meningitidis*.

Seront ensemencés au minimum :

- une gélose « chocolat » au sang cuit additionnée d'un supplément vitaminique ;
- une gélose au sang.

Pour le cas des sites potentiellement plurimicrobiens, on pourra ensemencer une gélose sélective pour l'isolement du méningocoque et du gonocoque. Il s'agit d'une gélose « chocolat » avec supplément vitaminique, additionnée de vancomycine, de colimycine, de triméthoprime, et d'un agent antifongique. Cependant, certaines *Neisseria* commensales (*N. lactamica* et *N. polysacchareae*) peuvent pousser sur ces milieux, de même que des espèces *Shigella* et *Kingella* et certaines souches de *B. catarrhalis.*

Certaines souches de gonocoque peuvent être inhibées par la vancomycine et le triméthoprime et ne pas pousser sur ces milieux ; aussi doit-on utiliser en parallèle pour les prélèvements génitaux le même milieu sans inhibiteurs.

Les *Neisseria* et *Branhamella* sont des cocci à Gram négatif, immobiles, aérobies stricts et oxydase positif.

Les colonies de méningocoque mesurent de 1 à 2 mm, en 18 à 24 heures, à 37 °C et présentent des bords réguliers. Elles sont blanches, grisâtres, plus ou moins muqueuses. Les colonies de gonocoques apparaissent au bout de 24 à 48 heures avec plusieurs morphologies évoquant une culture polymicrobienne avec des tailles variables et un bord irrégulier. *Branhamella catarrhalis* apparaît sous forme de colonies blanches à bord net,

caractérisées par le fait que les colonies glissent sur la gélose quand on essaie de les prélever (comme un palet de hockey).

Les autres *Neisseria* sont lisses ou rugueuses, souvent pigmentées en jaune. S'il y a une suspicion de gonocoque ou de méningocoque, les colonies peuvent être repiquées sur milieu sélectif à condition de prélever des colonies issues d'une culture jeune (18 à 24 heures) pour éviter l'autolyse.

Diagnostic d'espèce

La catalase est positive, sauf pour *N. elongata*.

Certains caractères biochimiques sont spécifiques d'espèce :

- hydrolyse de la tributyrine et production d'une DNAse pour *B. catarrhalis* ;
- hydrolyse de l'ONPG pour *N. lactamica* ;
- présence d'une gamma-glutamyl transférase (γGT) pour *N. meningitidis* et les *Neisseria* commensales *N. sicca*, *N. subflava*, *N. flava*, *N. macacae*.

Les souches de gonocoque et de méningocoque sont toutes les deux glucose positives mais se différencient par l'acidification du maltose et la présence de γGT, deux caractères positifs pour le méningocoque mais négatifs pour le gonocoque.

Le tableau 29.2 résume les caractères biochimiques des différentes espèces.

Différentes galeries peuvent être utilisées, comme l'API NH® de bioMérieux (résultat en 2 heures), la galerie Vitek NH® de bioMérieux (résultat en 6 à 8 heures) ou la galerie Neisseria 4H® (Sanofi Pasteur ; résultat en 4 heures). Toutes ces galeries sont ensemencées avec des inoculums lourds.

Il faut noter que des souches de méningocoque déficientes (glucose et/ou maltose) ont été décrites.

L'identification au niveau de l'espèce des souches de *Neisseria* les plus couramment rencontrées en pathologie humaine sont aussi parfaitement réalisées par spectrométrie de masse type MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight*). Un certain nombre d'espèces de *Neisseria* Spp atypiques sont décrites dans le chapitre 30.11 avec les bactéries du groupe HACEK.

Typages immunologiques et génétiques de *N. meningitidis*

N. meningitidis est une espèce bactérienne hautement variable génétiquement, du fait de sa compétence naturelle à la transformation. Des échanges horizontaux d'ADN entre les différentes souches de méningocoques et entre différentes *Neisseria* sont à l'origine de la structure en mosaïque qui caractérise beaucoup de gènes chez le méningocoque. L'utilisation de techniques de typages génétiques permet de suivre et de surveiller l'épidémiologie des infections méningococciques. Le principe de toutes ces techniques est d'analyser le polymorphisme de plusieurs loci chromosomiques. Les souches sont soumises à la caractérisation de certains constituants de la structure identifiés à l'aide de techniques historiquement immunologiques et de plus en plus génomiques (Fig. 29.6). Certaines de ces techniques sont réalisables par les laboratoires de bactériologie classiques (sérogroupes voire certains typages génétiques), d'autres seulement par le Centre national de référence (CNR). Les souches de méningocoques isolées des porteurs asymptomatiques sont très hétérogènes, alors que les souches invasives se regroupent de manière plus évidente selon des profils génétiques particuliers définissant des complexes clonaux.

Les souches peuvent être caractérisées par une formule fruit des différents typages avec un exemple de *N. meningitidis* (Fig. 29.7).

Détermination du sérogroupe

Le méningocoque a la particularité de posséder une capsule polysaccharidique qui a des propriétés antigéniques permettant de classer les souches de méningocoque en 12 sérogroupes : A, B, C, X, Y, Z, 29E, W, H, I, K, L.

Il est possible d'identifier le sérogroupe soit par agglutination d'une suspension bactérienne en présence d'antisérums (vendus par différents fabricants), soit à l'aide de particules de latex sensibilisées avec des antisérums. Il est préférable de réaliser l'agglutination à partir de colonies de 18 à 24 heures sur milieu de Mueller-Hinton qui permet un bon développement du polyoside capsulaire. Les réactions peuvent être difficiles à lire à partir de la gélose « chocolat ». Si l'identification du sérogroupe est difficile, on peut refaire le test après avoir chauffé une suspension bactérienne dense réalisée en eau physiologique pendant 30 minutes à 60 °C. Il existe des réactions croisées entre *N. meningitidis* sérogroupe B et *Escherichia coli* K1.

Détermination de l'immunotype

L'immunotype est déterminé uniquement au niveau du CNR à l'aide d'anticorps monoclonaux.

Détermination du sérotype

La détermination du sérotype est généralement réalisée par le CNR, soit à l'aide d'anticorps monoclonaux, soit par détermination de la séquence nucléotidique de deux régions variables, VR1 et VR2, du gène *porA* qui code PorA, une porine de type 1 qui est un constituant majeur de la membrane externe.

Détermination du sous-type

La détermination du sous-type est aussi généralement réalisée par le CNR, soit à l'aide d'anticorps monoclonaux, soit par détermination de la séquence nucléotidique du gène *porB* qui est aussi une porine de la membrane externe.

Détermination de la famille clonale et du clone MLEE

Les souches épidémiques sont groupées dans un nombre limité de complexes clonaux. Ils sont souvent désignés par ET et/ou ST (électrotype selon la technique d'électrophorèse des iso-enzymes ou *multilocus enzyme electropherotype* [MLEE], ou séquence type selon la technique de *multilocus sequence typing* [MLST], respectivement). La technique MLEE consiste à analyser les variations d'enzymes métaboliques en mesurant la mobilité électrophorétique sur gel des protéines enzymatiques étudiées. Cette technique a permis la mise en évidence de complexes clonaux hyperinvasifs responsables d'infections graves. Cette technique est longue et peu comparable d'un centre à l'autre. Elle est maintenant remplacée par la

Tableau 29.2 **Caractères différentiels des espèces du genre *Neisseria*.**

Espèces	Morphologie bactérienne	Fréquence d'isolement	Croissance milieu sélectif	Pigment	Acidification					γGT	Synthèse de polysaccha-rides	NO_3–	NO_2–	DNase
					GLU	MAL	LEV	SAC	LAC					
Groupe I														
N. gonorrhoeae	C	F	+	G	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
N. meningitidis	C	F	+	G	+	+	–	–	–	+	–	–	+/–	–
N. lactamica	C	F	+	(+)J	+	+	–	–	+	–	–	–	+	–
N. polysacchareae	C	F	+	(+)J	+	+	–	+/–	–	–	+	–	+	–
Groupe II														
N. subflava	C	F	–	+J	+	+	–	–	–	+	–	–	+	–
N. flava	C	F	–	+J	+	+	+	–	–	+	–	–	+	–
N. perflava	C	F	–	+/–J	+	+	+	+	–	+/–	+		+	–
N. sicca	C	F	–	+/–J	+	+	+	+	–	+	+		+	–
N. mucosa	C	F	–	+/–J	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–
N. cinerea	C	AF	–	(+)J	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
***Neisseria* exceptionnelles**														
N. canis	C	R	–	(+)J	+/–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
N. denitrificans	C	E	–	G	+	–	+	+	–	–	+	–	+	–
N. flavescens	C	E	–	+++J	–	–	–	–	–	+/–	+	–	+	–
N. macacae	C	E	–	G	+	+	+	+	–	+	+	–	+	–
N. elongata	B	R	–	O	+/–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
B. catarrhalis	B	F	–*	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+

AF : assez fréquent ; B : bâtonnets ; C : coques ; E : exceptionnel ; F : fréquent ; J : jaune ; G : grisâtre ; γGT : gamma-glutamyltransférase ; GLU : glucose ; LAC : lactose ; LEV : lévulose ; MAL : maltose ; R : rare ; SAC : saccharose.
Toutes les espèces décrites dans ce tableau sont tributyrinase et désoxyribonucléase négatives.
* +10 % ; (+) : faible ; +/– : certaines souches négatives d'autres positives.

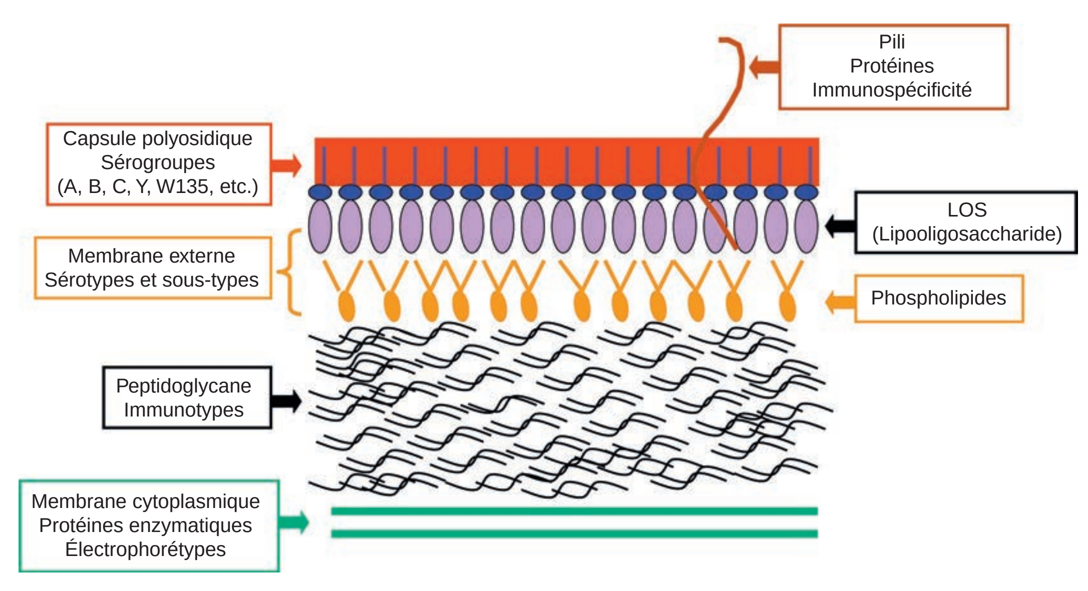


Fig. 29.6 Paroi de *N. meningitidis* et marqueurs épidémiologiques. *(Adapté d'E. Bingen.)*

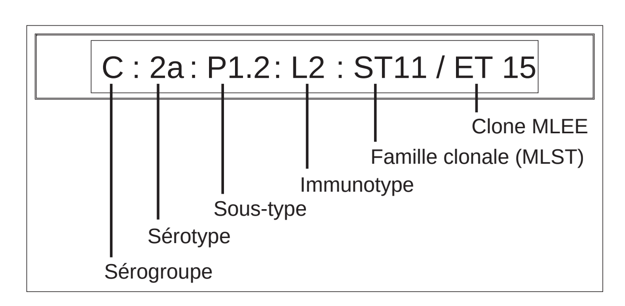


Fig. 29.7 Exemple de caractérisation complète d'une souche de *N. meningitidis* groupe C. MLEE : *multilocus enzyme electrophoretype*; MLST : *multilocus sequence typing*.

MLST. Cette technique consiste à analyser une séquence de 400 à 500 paires de bases interne à sept gènes codants des protéines de ménage. Les séquences obtenues sont alors transférées sur le site http://pubmlst.org/neisseria/ qui leur donne un numéro d'allèle. Les sept allèles alors obtenus pour une souche donnent la séquence type (ST) de la souche. Différentes souches peuvent ainsi être comparées grâce à leur ST. En Europe, on trouve essentiellement des souches du complexe ET-5/ST32 ou du lignage III/ST41-44 (qui comportent en majorité des souches de sérogroupe B), des souches appartenant au complexe ET-37/ST11 (majoritairement des souches de sérogroupe C et du sérogroupe W135). En France, au sein du groupe B, on a observé en 2009 la baisse des souches du complexe ST-32 qui sévissait en Seine-Maritime, mais l'émergence du complexe ST-269, en particulier dans les Landes.

Les souches de méningocoque isolées dans des infections invasives méningococciques doivent être envoyées au CNR qui confirme l'identification des souches. Le milieu le mieux adapté pour le transfert est le milieu gélosé dit VDK décrit par Vandekerkove.

Diagnostic sans culture

Recherche d'antigènes solubles

La recherche d'antigènes solubles des principaux sérogroupes du méningocoque peut être effectuée dans le LCR et/ou le sérum. On trouve commercialisés des latex permettant la recherche des antigènes capsulaires de *N. meningitidis* : A, B et C. Il faut toutefois souligner que dans les pays en voie de développement et dans un contexte épidémique, cette recherche d'antigènes et le groupage par agglutination latex (sur LCR liquide ou extrait de papier buvard) rend de précieux services. On ne peut que regretter que des trousses recherchant les antigènes capsulaires avec groupage par technique d'immunocapture (plus sensible) n'aient pas été développées dans un contexte de terrain. Il est à noter que cette recherche n'est pas très sensible et qu'en cas de faible quantité de prélèvements, il vaut mieux privilégier la détection par biologie moléculaire.

Recherche directe du génome par biologie moléculaire

La recherche du génome de méningocoque par PCR, point final ou temps réel, permet d'identifier des cas d'infections invasives à méningocoque pour lesquelles la culture reste négative. Deux cibles sont généralement utilisées, le gène *ctrA* qui code une protéine de la membrane externe impliquée dans le transport de la capsule, ou le gène *crgA* qui code une protéine impliquée dans la régulation de l'adhésion de la bactérie aux cellules. On caractérise ainsi des séquences spécifiques de l'espèce *N. meningitidis*. Mais on peut aussi réaliser directement sur l'échantillon une identification du sérogroupe en pratiquant des PCR portant sur les gènes *siaD* pour les groupes B, C, Y, W135 ou *orf* 2, *myn A* pour le groupe A. La positivité de la PCR ne saurait préjuger de la viabilité du germe. Cette technique reste la plus performante mais ne permet pas d'isoler la souche. Elle est soit développée localement en recourant à une technique dite « maison », soit réalisée à l'aide de kits de détection mis sur le marché par différentes firmes. Un

contrôle interlaboratoire d'ADN bactérien réalisé en 2009 a montré une identification correcte de *N. meningitidis* dans 81 % des laboratoires et respectivement dans 80 %, 65 % et 70 % des cas pour les sérogroupes A, B et C. Cette analyse peut être effectuée sur LCR, sérum ou à partir de lésions purpuriques.

En ce qui concerne le gonocoque, la recherche de génome par biologie moléculaire sur prélèvement est effectuée à l'aide de kits commercialisés ciblant généralement les gènes *pgi1*, *opa*, *porA* ou *rDNA 16S*. Il est à noter que généralement cette recherche est faite en parallèle de la recherche de *Chlamydia trachomatis*.

Sensibilité aux antibiotiques

Les *Neisseria* et *Branhamella* sont normalement sensibles à la pénicilline et aux autres β-lactamines, aux aminosides, phénicolés, macrolides, tétracyclines, quinolones, sulfamides, rifampicine. Elles sont naturellement résistantes à la vancomycine, la teicoplanine et au triméthoprime.

N. meningitidis et *N. gonorrhoeae* sont résistantes à la colistine ainsi qu'aux lincosamides, de même que *B. catarrhalis*. L'étude de la sensibilité par la méthode de diffusion en milieu gélosé sera effectuée sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 5 % de sang de mouton, selon les recommandations du CA-SFM.

Les céphalosporines de troisième génération sont les molécules recommandées pour le traitement de première intention des **méningites à méningocoque**, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la ceftriaxone ou du céfotaxime étant très basses (0,002 à 0,008 mg/l).

Cependant, le méningocoque a su développer des résistances aux antibiotiques auxquels il est habituellement sensible. Des souches de sensibilité diminuée à la pénicilline G ont été décrites (CMI ≥ 0,125 µg/l) et représentaient 22 % des souches isolées d'infections invasives en 2008 et 24 % de l'ensemble des souches en 2014. Le méningocoque est une bactérie naturellement compétente et peut donc acquérir facilement et à tout moment des fragments d'ADN étranger. Ainsi, des échanges génétiques entre *N. meningitidis* et des *Neisseria* commensales naturellement résistantes à la pénicilline G ont abouti à la formation de gènes de protéines de liaison à la pénicilline (PLP) modifiés. Ces gènes dits « mosaïques » codent des PLP dont l'affinité pour la pénicilline G est diminuée. C'est le cas du gène *penA* qui code la PLP2.

Des souches productrices de β-lactamase plasmidique (de type TEM-1) ont été décrites chez des méningocoques mais sont exceptionnelles. La recherche d'une pénicillinase à l'aide d'un test chromogénique est cependant recommandée. Pour l'instant, en France, aucune souche de ce type n'a été décrite.

Pour dépister les souches de sensibilité diminuée, le CA-SFM 2013 recommande d'utiliser un disque d'oxacilline 5 µg. Si le diamètre d'inhibition est < 18 mm, la souche est considérée comme de sensibilité diminuée à la pénicilline G et il convient de déterminer les CMI de la pénicilline G et de l'amoxicilline à l'aide d'E-tests® en respectant les recommandations du CA-SFM.

Des résistances aux autres antibiotiques ont aussi été décrites : sulfamides (> 50 % des souches résistantes), chloramphénicol, tétracyclines, macrolides (notamment spiramycine) et rifampicine. Ces deux derniers antibiotiques étaient utilisés jusqu'en 2006, uniquement en prophylaxie chez les sujets contacts. De rares souches intermédiaires ou résistantes à la rifampicine ont été décrites, avec des mutations dans le gène *rpo*B codant la sous-unité β de l'ARN polymérase. En revanche, depuis quelques années, les souches résistantes à la spiramycine sont en nette augmentation.

L'antibiogramme des méningocoques selon le CA-SFM (2013) doit tester au minimum la pénicilline G ou l'amoxicilline, le céfotaxime ou la ceftriaxone, la rifampicine et l'acide nalidixique.

Les **infections à gonocoque** sont généralement traitées en dose unique. Différentes molécules peuvent être utilisées : céfixime per os, spectinomycine intramusculaire (IM), fluoroquinolones per os, ceftriaxone IM.

Des souches de gonocoques résistantes à la pénicilline par production d'une β-lactamase plasmidique (de type TEM-1) ont été décrites et ont déjà été isolées en France. Cette résistance doit faire l'objet d'une détection par un test chromogénique.

En 2013, 79 % des souches étaient résistantes à la pénicilline.

Comme pour la pénicilline, la résistance à la tétracycline n'a cessé d'augmenter pour atteindre 88,6 % en 2013.

Pour le céfixime et la ceftriaxone, bien qu'une augmentation des CMI des souches soit observée, aucune souche résistante n'a jusqu'à présent été retrouvée en France.

La résistance aux quinolones sera détectée en testant l'acide nalidixique ; si le diamètre d'inhibition est < 25 mm, les CMI de l'ofloxacine ou de la ciprofloxacine seront déterminées. Concernant la ciprofloxacine, la résistance a augmenté jusqu'en 2006 et est à peu près stable depuis, à 43 % en 2013.

Le taux de souches résistantes à l'azithomycine est estimé à 1,3 % en 2013.

Pour la spectinomycine, aucune souche résistante n'a jusqu'à présent été retrouvée en France.

L'antibiogramme des gonocoques selon le CA-SFM 2013 doit tester au moins la pénicilline, la ceftriaxone, le céfixime, la spectinomycine, la tétracycline, l'acide nalidixique et la ciprofloxacine ou l'ofloxacine.

Pour *B. catarrhalis*, 90 % des souches produisent une β-lactamase qui est difficile à détecter par les techniques classiques d'antibiogramme et qui doit être recherchée par un test chromogénique. Les pénicillines et céphalosporines de 1re et 2e générations ne sont alors plus actives. Les souches résistantes aux tétracyclines sont rares, de même qu'aux macrolides, à la rifampicine et aux sulfamides.

Prise en charge et prophylaxie des infections invasives à méningocoque

Les infections invasives à méningocoque sont une urgence thérapeutique. Selon le Conseil supérieur d'hygiène publique de France, tout malade présentant des signes infectieux et, à l'examen clinique, lorsqu'il a été totalement dénudé, un purpura comportant au moins un élément nécrotique ou ecchymotique de diamètre ≥ 3 mm doit immédiatement

recevoir une première dose d'un traitement antibiotique approprié aux infections à méningocoque (céphalosporine de 3e génération le plus souvent), si possible par voie intraveineuse, sinon par voie intramusculaire, et ce quel que soit l'état hémodynamique du patient.

Dans l'entourage du patient, une prophylaxie des sujets contacts doit être réalisée afin de limiter les cas secondaires. Sont définis comme sujets contacts des personnes ayant eu des contacts répétés et rapprochés avec le patient. Cette prophylaxie repose sur :

- la chimioprophylaxie : la molécule de première intention est la rifampicine pendant 2 jours. En cas de contre-indication et/ou de résistance documentée, la ciprofloxacine per os ou la ceftriaxone par voie injectable, en dose unique, peuvent être utilisées. La spiramycine n'est plus recommandée. Cette chimioprophylaxie doit être réalisée le plus tôt possible et n'a pas d'intérêt au-delà de 10 jours après le dernier contact avec le cas ;
- la vaccination : Il n'existe pas de vaccin polysaccharidique, mais des vaccins protéiques sont développés pour le sérogroupe B.

Un vaccin polysaccharidique A, C, Y, W est resté longtemps le seul disponible.

Puis, on a disposé de vaccins conjugués, notamment pour le groupe C, le polysaccharide étant conjugué soit avec la protéine CRM_{197} de *Corynebacterium diphtheriae*, soit avec de l'anatoxine tétanique. Ce vaccin conjugué C fait l'objet depuis 2010 d'une vaccination systématique pour les nourrissons de 12 à 24 mois avec extension jusqu'à l'âge de 24 ans avec une seule dose.

Depuis 2010 également, un vaccin quadrivalent A, C, Y, W conjugué avec la protéine CRM_{197} est aussi disponible et recommandé dès l'âge de 11 ans.

Pour en savoir plus

Avis du Haut conseil de la santé publique relatif à la vaccination par le vaccin méningococcique conjugué de sérogroupe C. BEH 2010 ; 14–15 : 138–41.

Bingen E. Méningites bactériennes communautaires. Paris : Elsevier ; 2001.

Diggle MA, Clarke SC. Molecular methods for the detection and characterization of Neisseria meningitidis. Expert Rev Mol Diagn 2006 ; 6 : 79–87.

Guide des vaccinations. La vaccination contre les méningocoques, www.sante.gouv.fr/index.html.www.microbes-edu.org/etudiant/etudiants.html ; 2008.

Jolley KA, BrehonY C, Maiden MCJ. Molecular typing of meningococci : recommendations for target choice and nomenclature. FEMS Microbiol Rev 2007 ; 31 : 89–96.

Parent du Chatelet I, Taha MK, Lepoutre A, et al. Les infections invasives à méningocoque en France en 2008. BEH 2009 ; 46–47 : 489–93.

Taha MK. Simultaneous approach of non culture PCR based identification and serogroup prediction of Neisseria meningitidis. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 855–7.

Taha MK, Alonso JM. Neisseria gonorrhoeae et Neisseria meningitidis. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. 2e éd. Paris : ESKA ; 2007. p. 931–8.

Taha MK, Claus H, Lappann M, et al. Evolutionary events associated with an outbreak of meningococcal disease in men who have sex with men. PLoS ONE 11(5):e0154047.

Adresses utiles

Centre national de référence des gonocoques
Institut Alfred Fournier
25, boulevard Saint-Jacques, 75680 Paris cedex 14

Centre national de référence des *Neisseria*
Institut Pasteur, Unité des *Neisseria*
25–28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15
Tél : 01 45 68 83 30
E-mail : meningo@pasteur.fr.
http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-reference/les-cnr/meningocoques.

Chapitre 30

Bacilles à Gram négatif aérobies et aéro-anaérobies

F. Denis, S. Le Hello, O. Barraud et al.

PLAN DU CHAPITRE

30.1 Généralités

F. Denis, M.-C. Ploy

Les bacilles à Gram négatif sont rencontrés très fréquemment en pathologie. Dans ce groupe figurent des familles bactériennes très variées sur le plan du type respiratoire et du caractère oxydase positif ou négatif, de même que pour leur exigence de culture.

Leur habitat est varié. Certaines espèces sont strictement humaines (*Salmonella* Typhi, *Haemophilus influenzae*), d'autres humaines et animales (nombreuses salmonelles, *Escherichia coli*, etc.), voire à dominante animale, l'homme n'étant qu'un hôte accidentel (*Brucella*, *Pasteurella*, etc.) ; d'autres, enfin, ont pour réservoir principal le milieu extérieur essentiellement hydrique (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*), à l'état libre ou associé à des amibes (*Legionella*).

La transmission peut se faire, selon les espèces, par simple contact, par morsure, griffure ou piqûre, par ingestion, par inhalation, etc.

Les pathologies dues à ces bacilles sont très diverses et si certaines espèces ont une spécificité syndromique méningée (*Haemophilus influenzae* b, *Escherichia coli* K1, etc.), entérique (*Escherichia coli*, *Salmonella*, etc.), génitale (*Gardnerella*), septicémique, endocardique, etc., d'autres ont un spectre pathogène très large.

Ces pathologies peuvent être isolées ou survenir dans un contexte épidémique nécessitant parfois de véritables enquêtes policières (typhoïde, diarrhées à *Escherichia coli* entérohémorragiques, choléra, légionellose, brucellose, etc.).

Devant ces différences d'habitat, de mode de transmission, de pouvoir pathogène, mais aussi de fragilité et d'exigence nutritive, il est évident que l'on ne dispose pas de milieu ou de technique polyvalente pour les rechercher, d'autant plus que certaines espèces font partie de la flore normale de l'homme (exemple des entérobactéries). Aussi, il est nécessaire d'avoir une approche syndromique en utilisant, selon la situation, des techniques de culture plus ou moins complexes ou de détection antigénique, voire de biologie moléculaire ou même de sérologie pour relier avec une forte présomption, si ce n'est une certitude, un tableau clinique à une bactérie donnée. Ces considérations viennent renforcer la nécessité d'un dialogue clinicobiologique permanent.

L'évolution technologique a bouleversé la taxonomie mais aussi la pratique du diagnostic bactériologique pour toutes les espèces, notamment à Gram négatif, avec le recours en particulier aux techniques d'analyse protéique par spectrométrie de masse MALDI-TOF ou les approches moléculaires avec séquençage.

Mais le biologiste ne doit pas faire une confiance aveugle à ces outils qui ne permettent pas toujours une discrimination entre tous les genres et espèces. L'isolement, la pureté des colonies, l'examen au Gram, la recherche de la mobilité et de caractères souvent simples permettent de corriger le tir et d'identifier correctement la bactérie.

Il importe donc que le microbiologiste ait une vision d'ensemble du prélèvement jusqu'au résultat, ce dernier devant être examiné avec circonspection.

Nous avons tous en mémoire des souches adressées à des centres régionaux qui avaient été étiquetées allègrement *Pseudomonas mallei* ou *Yersinia pestis* alors que le patient n'avait jamais quitté l'Hexagone et ne présentait aucun tableau clinique compatible avec une morve ou une peste.

À l'inverse, nous avons reçu des souches d'*Escherichia coli* dans un contexte de diarrhée qui étaient en fait des *Shigella* responsables de syndromes dysentériques authentiques.

Le biologiste doit aussi comparer les isolements de bacilles à Gram négatif provenant de sites différents pour un patient donné, des prélèvements contemporains et antérieurs ; de même, il lui appartiendra de donner l'alerte quand il constate la présence dans le même service ou le même établissement de souches appartenant à une espèce rare ou porteuses de profils de résistance atypique, notamment de multirésistances (BLSE, etc.).

Enfin, comme l'écrit l'un des auteurs du chapitre : « Toutes les réactions […] paraissant incompatibles avec un diagnostic probable doivent être refaites par les méthodes conventionnelles ». Utilisons au maximum les nouveaux outils, le progrès, mais avec un œil critique et du bon sens.

Pour certaines espèces telles que *Bordetella pertussis*, la PCR ne doit pas faire oublier l'intérêt de l'isolement qui permettra seul la caractérisation des souches et d'éventuels variants ayant un intérêt épidémiologique (perte de pertactine par exemple).

Le biologiste a certes un rôle central dans le diagnostic et le traitement, mais il est aussi un acteur de santé public en participant aux réseaux épidémiologiques.

30.2 *Enterobacteriaceae* (y compris *Yersinia*)

S. Le Hello, M.-C. Ploy, F. Denis

Généralités

Les *enterobacteriaceae* sont des bacilles à Gram négatif, le plus souvent courts (1 à 6 µm), droits, immobiles ou mobiles par une ciliature péritriche, de culture aisée, aéro-anaérobies facultatifs, fermentaires, oxydase négative, catalase positive (à l'exception de *Shigella dysenteriae* type 1), nitrate réductase positive (rares exceptions chez *Erwinia*).

Pouvoir pathogène et habitat

Il s'agit d'une très vaste famille qui représente près des trois quarts des isolements d'un laboratoire de bactériologie médicale. Ce sont pour la plupart des hôtes du tractus digestif (d'où leur nom), mais certaines, telles les *Serratia*, sont rencontrées d'une manière prépondérante dans le milieu extérieur.

Les entérobactéries sont responsables de deux grands types de manifestations pathologiques : une pathologie spécifique telle la typhoïde avec *Salmonella* Typhi, ou une pathologie opportuniste, notamment dans le cadre d'infections nosocomiales.

Près de 200 espèces ont été décrites pour plus de 40 genres, mais seuls une vingtaine d'espèces sont plus com-

munément isolées en bactériologie clinique et appartiennent aux genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*. D'autres genres peuvent être isolés rarement ou exceptionnellement chez l'homme : *Cedecea*, *Ewingella*, *Erwinia*, *Kluyvera*, *Leminorella*, *Pantoea*, *Rahnella*. Certaines espèces sont encore découvertes comme *Rouxiella chamberiensis*, nouvelle espèce mise en cause lors d'infections néonatales dues à la contamination de poches de nutrition parentérale.

Classification

L'ère de la génomique (hybridations ADN-ADN, gènes des ARN ribosomiques, *rpoB*, MLST, séquençage complet) a bouleversé la taxonomie des entérobactéries. De nouveaux genres tels *Hafnia* et *Pantoea* sont apparus (issus du genre *Enterobacter*).

Les souches de *Yersinia pestis* appartiennent au *genomospecies Y. pseudotuberculosis* et les souches du genre *Shigella* au *genomospecies Escherichia coli*. Cependant, du fait de leurs pouvoirs pathogènes particuliers, elles ont été maintenues comme espèces à part entière. De même, l'agent de la donovanose, anciennement *Calymmatobacterium granulomatis*, bien que non cultivable sur les milieux usuels, est maintenant inclus au sein du genre *Klebsiella* (*K. granulomatis*).

La classification traditionnelle en « tribus » fondée sur quelques caractères biochimiques (VP, TDA) est actuellement caduque sur le plan taxonomique. Néanmoins, elle a le mérite d'offrir au microbiologiste un moyen pratique de s'orienter dans l'identification d'une entérobactérie. La figure 30.1 présente en parallèle la phylogénie des principales entérobactéries d'intérêt médical et la classification traditionnelle.

Plesiomonas shigelloides est maintenant considéré comme une entérobactérie proche du genre *Proteus*. Cependant, du fait de ses caractères divergents (oxydase positive, sensibilité au composé vibriostatique O/129), nous ne l'inclurons pas dans ce chapitre (voir chapitre 30.3).

Caractères bactériologiques et technologie générale

Caractères culturaux

L'ensemble de ces bactéries pousse habituellement très aisément sur milieux ordinaires. La température optimale de croissance est généralement de 35 à 37 °C, à l'exception

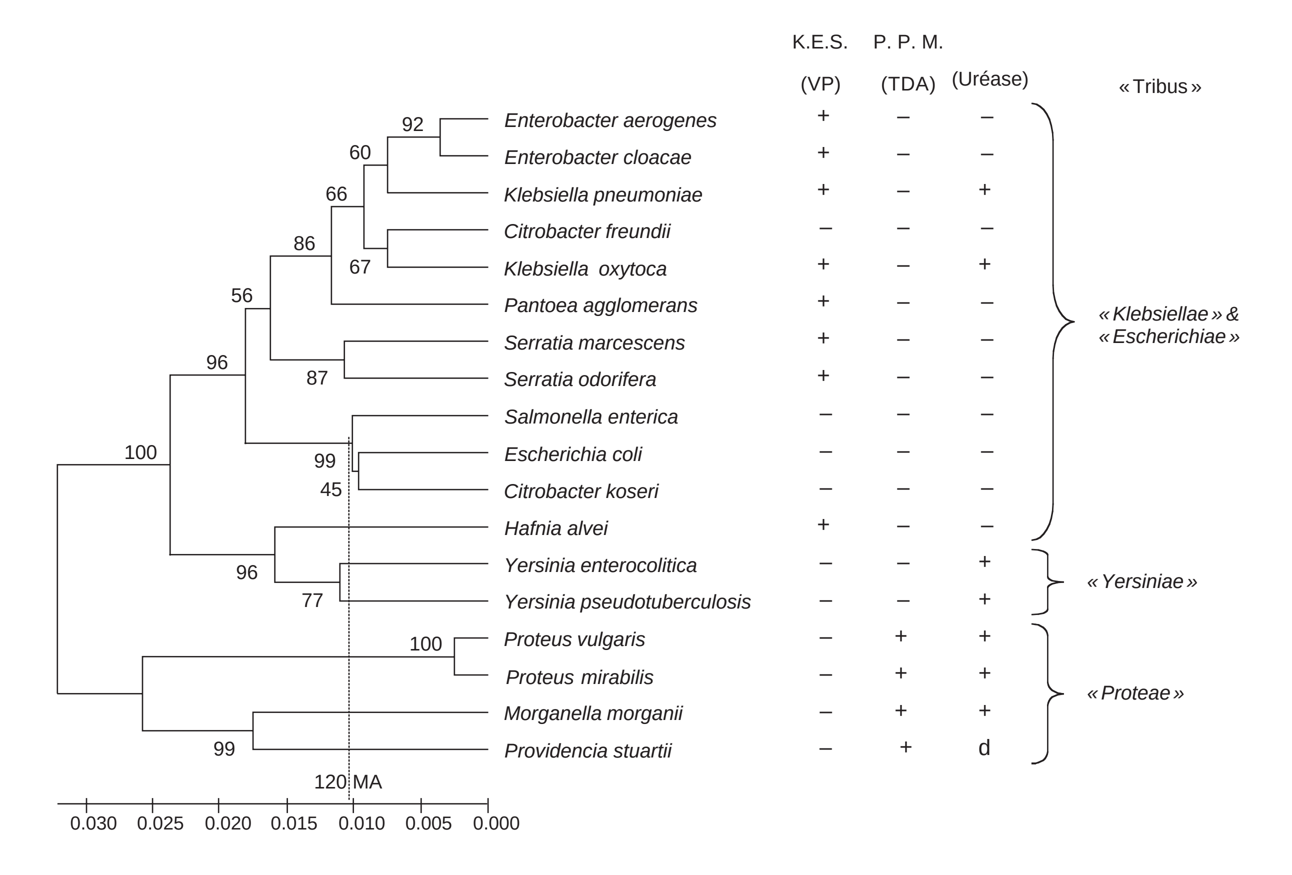


Fig. 30.1 Arbre phylogénétique construit selon la méthode UPGMA à partir des séquences d'ARNr16S (1440 bases). Les valeurs de bootstraps sur 100 réplications sont indiquées à chaque nœud. Échelle de temps (MA : millions d'années). *(D'après : Ochman et Wilson. Evolution in bacteria : evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. J Mol Evol 1987 ; 26 : 74-86.)*

des *Yersinia* (30 à 37 °C), des *Pantoea* et des *Erwinia* (27 à 30 °C), certaines ne poussant pas à 37 °C.

Elles sont toutes aéro-anaérobies facultatives, encore que certaines *Erwinia* puissent donner une culture plus lente en anaérobiose.

L'aspect général des colonies de ces bactéries sur gélose nutritive est florissant : colonie de 1 à 3 mm de diamètre généralement bombées, lisses et brillantes. Il existe de nombreuses exceptions :

- colonies petites pour *Shigella dysenteriae*, *Salmonella Typhi*, *Yersinia* ;
- envahissement de la gélose en voile, montrant des vagues successives pour *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris*.

Le plus souvent, ces colonies sont opaques et blanchâtres, mais il en est de plus transparentes telles les *Salmonella*, des pigmentées telles les *Serratia* en rouge ou les *Erwinia* en jaune.

Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges et luisantes.

Enfin, des dissociations peuvent s'observer entre variants : muqueux, lisse ou *smooth* (S), rugueux ou *rough* (R).

Caractères biochimiques

C'est dans le domaine des *Enterobacteriaceae* que l'évolution technologique a été la plus importante en bactériologie médicale avec une tendance à l'automatisation et l'utilisation de techniques innovantes fondées sur une approche moléculaire (séquençage du gène *rpoB* ou séquençage complet) ou spectrométrique. Cependant, l'expertise biochimique reste essentielle lors d'identifications incertaines mais aussi d'un point de vue épidémiologique et pathogénique à la recherche d'expression phénotypique particulière ou déficiente.

L'ère d'identification en tubes uniques pourrait ressurgir pour s'assurer de certaines particularités biochimiques (exemple de production de gaz pour *E. coli*/*Shigella*, absence de fermentation du sorbitol pour *E. coli* O157, etc.), mais en pratique quotidienne c'est celle des galeries systèmes prêts à l'emploi qui prédomine.

Bien souvent d'ailleurs, le principe d'identification proposé est établi à partir d'une méthode probabiliste qui consiste à traduire numériquement la séquence des caractères positifs trouvés et à confronter le profil trouvé au catalogue des profils recensés par le fabricant. Les difficultés surgissent quand le profil numérique ne figure pas dans le catalogue ou conduit à une discrimination insuffisante entre plusieurs espèces ou genres (< 10 % des cas).

Il faut impérativement reprendre le problème à la base, s'assurer d'abord que la culture est pure et qu'il s'agit bien d'un bacille à Gram négatif oxydase négative, de vérifier son caractère mobile ou immobile.

Ces quelques vérifications simples permettent d'éliminer rapidement une partie des problèmes. Une fois celles-ci effectuées, il faudra reprendre une démarche traditionnelle :

- vérifier l'ensemble des caractères de définition de la famille ;
- placer la souche dans une des tribus constituant la famille des *Enterobacteriaceae* ;
- enfin, déterminer le genre et l'espèce au sein de ces tribus.

On pourra tenir compte pour cette démarche traditionnelle des réactions obtenues avec les systèmes prêts à l'emploi.

Il n'existe, avec les systèmes les plus évolués, qu'un petit nombre de réactions faussement positives ou négatives par rapport aux méthodes traditionnelles. Ces erreurs ne sont pas toujours dues au système lui-même, mais à l'ensemencement ou à l'incubation ; par exemple, la réaction de Voges-Proskauer n'est parfois positive qu'à 22 °C mais toute la galerie est incubée à 37 °C ; il est de plus impératif de bien respecter le temps d'attente après ajout des réactifs, une lecture trop rapide de la galerie pouvant conclure à une réaction de Voges-Proskauer faussement négative.

Toutes les réactions douteuses ainsi que toutes les réactions paraissant incompatibles avec un diagnostic probable devront être refaites par les méthodes conventionnelles. Certains caractères métaboliques peuvent être de nature plasmidique telles la production d'H_2S chez *Escherichia coli*, la fermentation du lactose chez *Proteus*.

Bien que le concept de tribu soit tombé en désuétude, il constitue une approche incomplète, mais simple, de cette vaste famille. Le diagnostic des quatre tribus qui intéressent la bactériologie médicale se fait sur un nombre limité de caractères (Tableau 30.1).

Utilisation de milieux chromogènes

Les activités enzymatiques utilisées dans les milieux de culture chromogéniques sont habituellement :

- β-D-glucuronidase ou β-D-galactosidase : permettant la détection d'*Escherichia coli* ;
- β-D-glucosidases : spécifiques du groupe KES-C (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp.) et aussi d'*Enterococcus* ;
- tryptophane désaminase : spécifique du groupe *Proteus, Morganella, Providencia* ;
- activité c8-estérase : pour la détection des *Salmonella*.

L'identification présomptive repose sur la coloration des colonies (Fig. 30.2) associée à l'examen direct par coloration de Gram complétée par un test biochimique complémentaire (indole pour *E. coli* et *Proteus*). Le non-respect strict de cette procédure expose à des erreurs d'identifications (rares souches de *Salmonella* spp., d'*Enterobacter* spp. exprimant une activité β-glucuronidase).

Caractères antigéniques

L'identification biochimique doit être complétée pour certains genres et espèces (*Salmonella, Shigella*) par la sérotypie. Celle-ci n'a de sens qu'une fois le genre et/ou l'espèce déterminé(e) car les communautés antigéniques interespèces et intergenres sont nombreuses. Les entérobactéries (Fig. 30.3) possèdent plusieurs types d'antigènes différents :

- antigènes O : antigène de paroi constitué de lipopolysaccharide (LPS) thermostable, perdu chez les souches R (colonies rugueuses) qui deviennent autoagglutinables en eau distillée ;
- antigènes H : antigènes flagellaires (bactéries mobiles) constitués de flagelline thermolabile ;
- antigènes K : antigène capsulaire (*Klebsiella* et certaines souches d'*E. coli*, *Shigella*, *Citrobacter* et *Salmonella*

Tableau 30.1 **Composition et caractères différentiels des tribus des *Enterobacteriaceae.***

	Escherichiae	***Klebsiellae* (VP +) (groupe KES)**	***Proteae* (TDA +)**	***Yersiniae***
Principaux genres isolés chez l'homme	*Escherichia*	*Klebsiella*	*Proteus*	*Yersinia*
	Shigella	*Raoultella*	*Providentia*	
	Salmonella	*Enterobacter*	*Morganella*	
	Citrobacter	*Cronobacter*	*Tatumella*	
	Edwardsiella	*Hafnia*		
	Kluyvera	*Pantoea*		
	Moellerella	*Erwinia*		
	Leclercia	*Serratia*		
	Leminorella	*Cedecea*		
	Yokenella	*Rahnella*		
	Trabulsiella	*Ewingella*		
TDA	–	–	+	–
Uréase	–	d	d	+*
VP à 37 °C	–	d	–**	–
VP à 22 °C	–	d	d	d
Mobilité	Tous sauf *Shigella* (quelques souches d'*Escherichia coli* immobiles)	Tous sauf *Klebsiella* et *Raoultella* Mobilité à 22 °C pour *Pantoea, Rahnella* et *Erwinia*	Tous sauf *Tatumella*	Immobiles à 37 °C, mobiles à 22 °C
Sensibilité à la colistine	Tous sauf *Edwardsiella, Moellerella* et *Yokenella*	Tous sauf *Serratia* et *Cedecea*	Aucun sauf *Tatumella*	d

d = différent suivant les genres ou les espèces.
* Sauf *Y. ruckeri*.
** Sauf *Tatumella*.

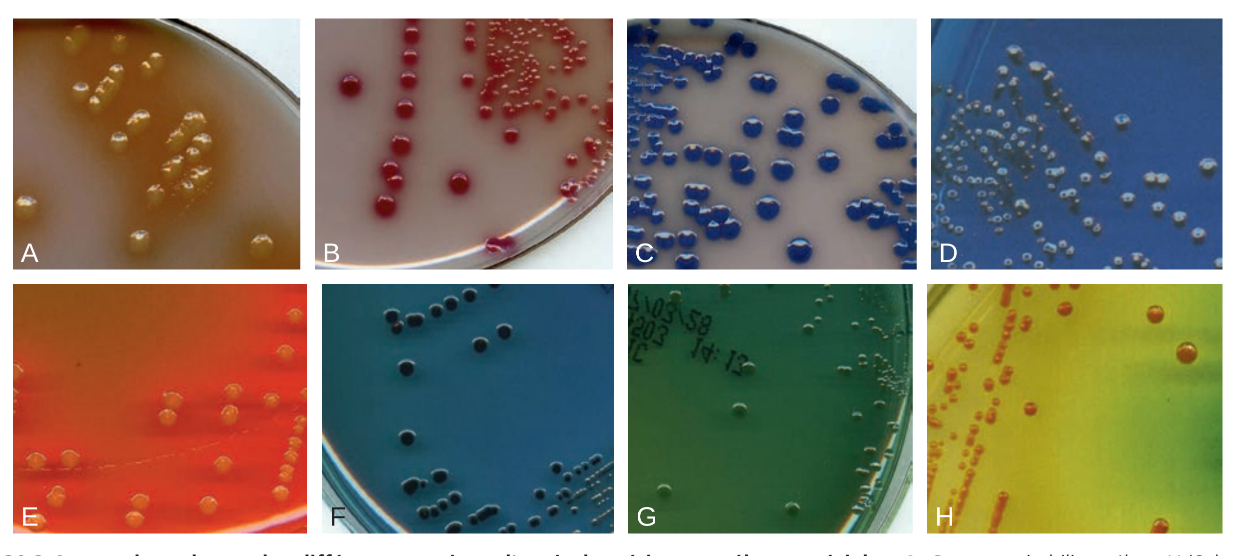


Fig. 30.2 Aspect des cultures des différentes espèces d'entérobactéries sur géloses spéciales. **A.** *Proteus mirabilis* : gélose UriSelect 4® (Bio-Rad), colonies brunes TDA positives. **B.** *Escherichia coli* : gélose UriSelect 4® (Bio-Rad), colonies roses β-galactosidase positives. **C.** *Klebsiella pneumoniae* : gélose UriSelect 4® (Bio-Rad), colonies bleues β-galactosidase positives. **D.** *Citrobacter freundii* : gélose Drigalski, colonies lactose négatives. **E.** *Escherichia coli* : gélose Hektoen, colonies lactose positives. **F.** *Salmonella enteritidis* : gélose Hektoen, colonies lactose négatives H_2S positives. **G.** *Shigella flexneri* : gélose Hektoen, colonies lactose négatives. **H.** *Escherichia coli* : gélose Drigalski, colonies lactose positives

« antigène Vi ») constitué de couches externes de polysaccharides qui peuvent masquer l'antigène O (une ébullition de 2 heures permet de démasquer l'antigène O chez ces souches) ;

- antigène de Kunin ou *Enterobacteriaceae common antigen* (ECA) constitué d'un glycophospholipide spécifique des entérobactéries ;
- antigènes d'adhésines (*pili*, *fimbriae*).

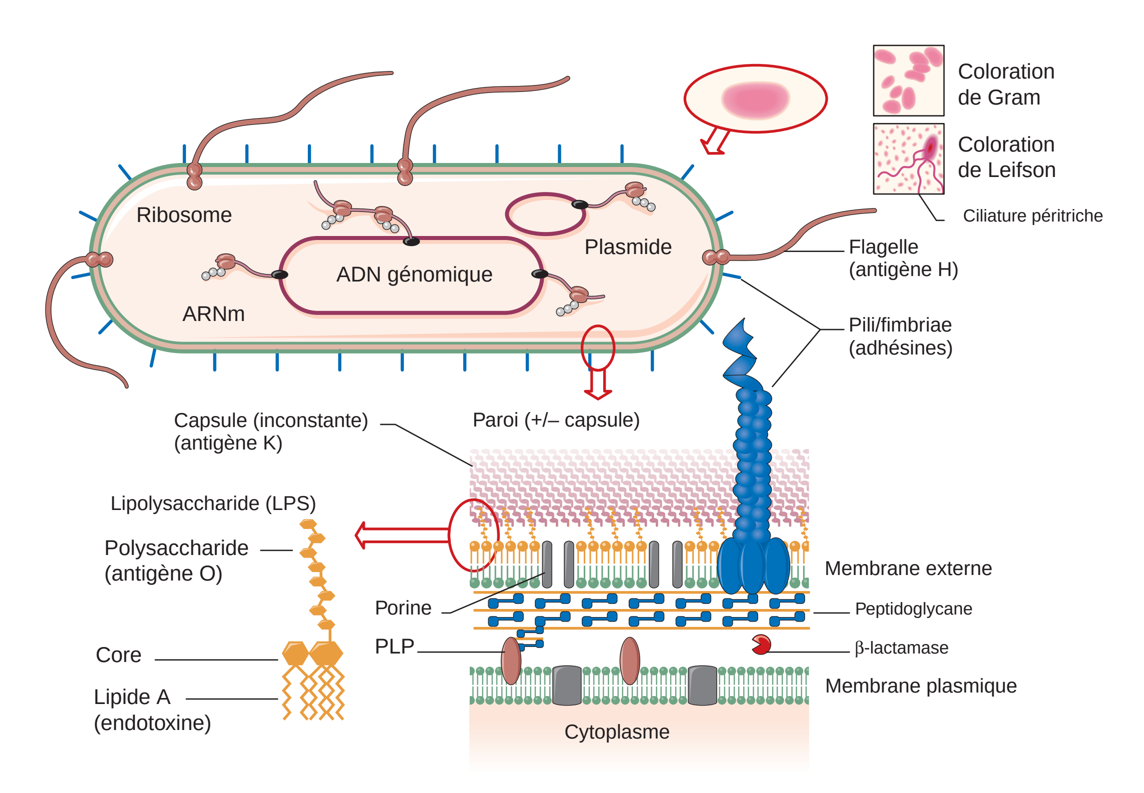


Fig. 30.3 Structure et aspect microscopique des *Enterobacteriaceae*.

Sensibilité aux antibiotiques

La résistance naturelle aux antibiotiques est aussi d'une grande aide à la démarche d'identification des *Enterobacteriaceae*. Toute divergence entre l'identification biochimique et le phénotype de résistance doit interpeller le biologiste et l'amener à vérifier l'identification du germe. Ainsi, les membres de la tribu des *Proteae* sont naturellement résistants aux nitrofuranes et à la colistine. Concernant la sensibilité aux β-lactamines, les entérobactéries sont classiquement divisées en 4 classes : celles qui ne produisent pas naturellement de β-lactamase comme *Salmonella* et *Proteus mirabilis* ou produisent une céphalosporinase à très bas niveau comme *Escherichia coli* et *Shigella* (classe 1) ; celles qui produisent naturellement une pénicillinase comme *Klebsiella*, *Citrobacter diversus* (anciennement *koseri*), *Citrobacter amalonaticus* et *Escherichia hermanni* (classe 2) ; celles (les plus nombreuses) qui produisent naturellement une céphalosporinase (classe 3) ; et celles qui produisent à la fois une pénicillinase et une céphalosporinase comme *Yersinia enterocolitica* (classe 4). D'autres enzymes particulières ne rentrent pas dans cette classification : céfuroximase de *Proteus vulgaris* et *Proteus penneri* ou β-lactamase à spectre étendue (BLSE) chromosomique de *Kluyvera*, *Rahnella*, *Citrobacter sedlakii* et *Erwinia persicina*.

Le tableau 30.2 répertorie les phénotypes de résistance naturelle des entérobactéries les plus fréquentes. Cette résistance naturelle est cependant brouillée par l'acquisition de mécanismes de résistance dont les supports génétiques sont souvent d'origine plasmidique mais quelquefois intégrés dans le chromosome via des îlots génomiques, comme le phénotype « pénicillinase de haut niveau » retrouvé chez près de la moitié des souches d'*Escherichia coli* et de *Proteus mirabilis*. L'émergence des BLSE et plus récemment des céphalosporinases et carbapénemases plasmidiques a encore davantage compliqué l'utilisation du phénotype de résistance pour l'identification bactérienne.

Spectrométrie de masse

La technique *matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight* (MALDI-TOF), qui utilise l'analyse des protéines bactériennes par spectrométrie de masse pour l'identification rapide d'espèce à partir de colonies, de culture en bouillon ou même de prélèvement, est actuellement en plein essor dans la plupart des laboratoires effectuant la bactériologie. Les études comparant la spectrométrie de masse avec l'identification moléculaire (séquençage du gène de l'ARN 16S ou du gène *rpo*B) ont montré une excellente concordance des deux méthodes pour l'identification des *Enterobacteriaceae*. Cette approche est aussi avantageuse du fait de sa rapidité à identifier plusieurs colonies sur boîtes et des développements sont en cours afin de reconnaître les activités enzymatiques de résistance aux antibiotiques acquises par les entérobactéries (exemple des carbapénemases). Cependant, quelques points sont importants à noter concernant cette nouvelle technique d'identification. D'une part, les souches du genre *Shigella* sont identifiées comme étant des *Escherichia coli*, ce qui est effectivement correct sur un plan purement taxonomique, mais très problématique si l'approche biochimique a été abandonnée par le laboratoire. D'autre part, de nombreux isolats du genre *Enterobacter* identifiés comme *E. cloacae* par les méthodes biochimiques sont identifiés en *E. hormaechei* par spectrométrie de masse, ces deux espèces proches partageant de nombreux caractères biochimiques.

Tribu des *Escherichiae* (entérobactéries VP –, TDA – et uréase –)

Ce groupe, défini par des caractères négatifs, comprend quatre genres principaux, à savoir les genres *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* et *Citrobacter* (Tableau 30.3). Les genres *Edwardsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Yokenella* qui possèdent les caractères biochimiques de définition de cette tribu sont rarement retrouvés dans les isolats humains.

Genre *Escherichia*

Ce genre comporte cinq espèces isolées chez l'homme (Tableau 30.4) : *E. coli*, *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* et *E. vulneris*. *E. blattae* isolé de cafards n'a jamais été retrouvé dans des prélèvements humains. *E. hermanii* et *E. vulneris*, dont les colonies apparaissent souvent pigmentées en jaune, ont été retrouvés dans des prélèvements de plaies. *E. hermanii* produit une pénicillinase naturelle (résistance à l'amoxicilline et à la ticarcilline). *E. albertii*, initialement confondu avec *Hafnia alvei*, a été isolé de selles diarrhéiques d'enfants et portait le gène *eae* des ECEP (voir plus loin). Cependant,

Tableau 30.2 **Phénotypes de résistance naturelle des principaux genres et espèces d'entérobactéries (d'après le communiqué du CA-SFM de janvier 2015).**

Espèce/genre	AM	AMC	TIC	C1G	FOX	CXM	GM	TET	COL	FT
Klebsiella	R		R							
Citrobacter diversus	R		R							
Citrobacter freundii	R	R		R	R					
Enterobacter cloacae	R	R		R	R					
Enterobacter aerogenes	R	R		R	R					
Serratia marcescens	R	R		R		R			R	
Proteus mirabilis								R	R	R
Proteus vulgaris	R			R		R			R	R
Morganella morganii	R	R		R					R	R
Providencia stuartii	R	R		R			R		R	R
Yersinia enterocolitica	R	R	R	R	R	R				

AM : aminopénicillines ; AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; C1G : céphalosporines de 1[re] génération ; COL : colistine ; CXM : céfuroxime ; FT : nitrofuranes ; FOX : céfoxitine ; GM : gentamycine ; R : résistance naturelle ; TET : tétracyclines ; TIC : ticarcilline.

Tableau 30.3 **Caractères différentiels des genres de la tribu des *Escherichiae*.**

	Escherichia coli	*Shigella*	*Salmonella*	*Citrobacter*	*Edwarsiella*	*Kluyvera spp.*	*Moellerella*	*Leclercia*	*Leminorella*	*Yokenella*
Mobilité	+[1]	–	+[3]	+	+	+	–	+	–	+
Indole	+	d	–	d	+	+	d	+	–	–
H_2S Hajna	–[2]	–	+[4]	d	+	–	–	–	+	–
Citrate Simmons	–	–	+[4]	d	–	+	d	–	d	+
ONPG	+[1]	d	D	+	–	+	+	+	–	+
LDC	d	–	+[4]	–	+	+	–	–	–	+
ODC	d	d	d	d	+	+	–	–	–	+
ADH	–	–	d	–	–	–	–	–	–	
Lactose[5]	+[1]	–	–	+	–	+	+	+	–	–
L-arabinose[5]	d	d	D	+	–	+	–	+	+	+
Sensibilité à la colistine	+	+	+	+	–	+	–	+	+	–

Toutes les souches sont TDA –, VP –, urée –, sauf plasmide métabolique.
d : différent selon les souches ; D : différent selon les sous-genres de *Salmonella*.
[1] Sauf *E. coli* biovar *alkalescens dispar*.
[2] Sauf plasmide métabolique.
[3] Sauf *S.* Gallinarum pullorum.
[4] Quelques souches négatives.
[5] Fermentation.

Tableau 30.4 **Caractères différentiels entre les différentes espèces des genres *Escherichia* et *Shigella*.**

	S. sonnei	***S. dysenteriae, S. flexneri* et *S. boydii***	***E. coli* immobile, agazogène**	***E. coli* mobile**	***E. fergusonii***	***E. hermannii***	***E. vulneris***	***E. albertii***
Pigmentation jaune des colonies	–	–	–	–	–	+	d	–
Mobilité (35 °C)	**–**	**–**	**–**	**+**	+	+	+	–
Gaz en glucose	**–**	**– (rares +)**	**–**	**+**	+	+	+	+
ONPG[1]	**+**	**– (d : *S. dysenteriae*)**	**d**	**+**	d	+	+	+
Indole[1]	**–**	**d**	**+**	**+**	+	+	–	–
LDC[1]	**–**	**–**	**d**	**d**	+	–	+	+
ODC[1]	**+**	**–**	**d**	**d**	+	+	–	+
β-glucuronidase	**d**	**d**	**d**	**+**	–	–	–	–
Lactose*	–	–	d	+	–	d	–	–
D-sorbitol*[1]	–	d	d	+	–	–	–	–
L-rhamnose*[1]	+	–	d	d	+	+	+	–
Adonitol*	–	–	–	–	+	–	–	–
Cellobiose*	–	–	–	–	+	+	+	–
Utilisation du malonate	**–**	**–**	**–**	**–**	d	–	+	–
Utilisation de l'acétate (milieu de Trabulsi et Edwards)	**–**	**–**	**+**	**+**	+	d	d	+
Citrate de Christensen	**–**	**–**	**d**	**d**	+	d	–	–

Les caractères en gras sont plus particulièrement utiles à l'identification des shigelles.
d = différent suivant les genres ou les espèces.
* Fermentation.
[1] Caractères disponibles sur galerie API 20E® (bioMérieux).

au sein du genre *Escherichia*, l'espèce *E. coli* représente la quasi-totalité des isolats humains. L'espèce *E. coli* présente une grande diversité sur le plan génétique et sur le plan du pouvoir pathogène.

Pouvoir pathogène et habitat

Escherichia coli est l'espèce la plus fréquemment isolée dans le laboratoire de bactériologie.

C'est un commensal de l'intestin de l'homme et des animaux représentant l'espèce aérobie quantitativement la plus importante de la flore digestive (10^6–10^9 bactéries par gramme de selles). La présence de colibacilles ou espèces voisines (les coliformes) dans l'eau est un témoin de contamination fécale (colimétrie). Mais c'est aussi le premier germe responsable d'infections communautaires et nosocomiales. Les infections à *E. coli* sont de deux types : infections intestinales à type de diarrhées et infections extra-intestinales. Les méthodes d'analyse moléculaire (MLST, ribotypage) ont montré que l'espèce *E. coli* pouvait être divisée en plusieurs groupes phylogénétiques dont quatre principaux (A, B1, B2 et D) regroupant la majorité des souches. Les souches d'*E. coli* commensales et celles responsables de diarrhées appartiennent majoritairement aux groupes A et B1, alors que celles responsables de pathologies extra-intestinales (infections urinaires, bactériémies et méningites) appartiennent majoritairement aux groupes D et B2.

Les souches responsables de diarrhées appartiennent à des sérotypes particuliers et possèdent des facteurs de virulence spécifiques de support plasmidique, chromosomique, ou portés par des phages. On distingue six pathovars entérovirulents :

- les ECEP (ou EPEC en anglais) : *E. coli* entéropathogènes responsables de diarrhées aqueuses chez l'enfant par adhésion localisée sur les entérocytes liée à l'intimine (gène *eae*) ;
- les ECEI (ou EIEC) : *E. coli* entéro-invasifs qui ont la propriété de pénétrer dans les cellules et de provoquer des syndromes dysentériformes : les ECEI sont très proches génétiquement de *Shigella* spp. ;
- les ECET (ou ETEC) : *E. coli* entérotoxinogènes qui sécrètent des toxines de deux types, ST (thermostable) et LT (thermolabile), et qui possèdent en outre des facteurs d'adhésion à la muqueuse intestinale. Ces souches sont responsables de syndromes cholériformes qui touchent principalement les enfants des pays en voie de développement et les voyageurs (« tourista ») ;
- les ECEH (ou EHEC) : *E. coli* entérohémorragiques responsables d'épidémies de diarrhées sanglantes d'origine alimentaire pouvant se compliquer de syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez l'enfant par la production de shigatoxines (ou vérotoxines) ; on parle aussi de STEC (*E. coli* producteurs de shigatoxines) ;

- les ECEA (ou EAEC) : *E. coli* entéroaggrégatifs responsables de diarrhées chroniques ou persistantes dans les pays en voie de développement, liés à une adhésion typique en « briques empilées » liées à des facteurs entéroaggrégants (aggR, aggA) ;
- les ECAD (ou DAEC) : *E. coli* à adhésion diffuse qui seraient responsables de diarrhées aqueuses chez l'enfant.

Le tableau 15.5 résume les différents pathovars responsables de diarrhées ainsi que les sérotypes et les gènes de virulence qui leur sont associés. À noter la possibilité d'évolution de certains pathovars en pathovars « mosaïques » comme l'a montré l'épidémie allemande de 2011 à *E. coli* O104:H4, ECEH ayant acquis le gène *aggR* (entéroaggrégatif).

Les souches responsables d'infections extra-intestinales sont isolées principalement d'infection urinaire. *E. coli* est de loin le premier germe responsable d'infection urinaire. En l'absence de malformations ou de reflux vésico-uréthral, les souches dites « uropathogènes » parviennent à coloniser l'arbre urinaire grâce à des adhésines (*pili* ou *fimbriae*). *E. coli* est également responsable d'infections maternofœtales, de prostatites et de suppurations diverses à partir de la flore digestive (infections des voies biliaires, péritonites, salpingites, infections postopératoires). Toutes ces infections peuvent se compliquer de septicémies. Chez le nouveau-né, la complication la plus redoutable est la méningite associée à la présence de l'antigène capsulaire K1 similaire à celui de *Neisseria meningitidis* du groupe B.

Identification

Les souches immobiles et agazogènes anciennement décrites comme *Alkalescens dispar* ne sont plus qu'un biovar d'*E. coli*. L'identification de ce biovar est parfois délicate car il peut être aisément confondu avec le genre *Shigella*. Le tableau 30.4 indique les réactions permettant de faire la distinction entre ces deux genres.

En dehors du problème du biovar *Alkalescens dispar*, il n'y a pratiquement pas de difficulté pour identifier *E. coli*. Les principaux caractères positifs sont l'indole, l'ONPG et le mannitol. Quelques caractères sont parfois aberrants : 4 % de souches sont non indologènes. Des caractères peuvent être codés par des plasmides telle la production d'H_2S. Sur milieu de MacConkey–sorbitol, les souches d'*E. coli* sont sorbitol positif, à l'exception d'une grande partie des ECEH de sérotype O157:H7. L'utilisation de milieux chromogènes permet de réaliser une identification présomptive d'*E. coli* par la recherche d'une β-D-glucuronidase ou d'une β-D-galactosidase dans les infections urinaires. Cette identification présomptive n'est valide que si elle s'accompagne d'un examen direct et d'une recherche positive de la production d'indole. Tout résultat discordant ou s'accompagnant d'un phénotype de résistance étendu ou rare doit faire réaliser une identification biochimique complète. Contrairement à la β-D-glucuronidase, la β-D-galactosidase n'est pas du tout spécifique d'*E. coli* et doit donc être interprétée avec la plus grande prudence.

À l'intérieur de l'espèce *E. coli*, on peut distinguer de multiples sérotypes. Il existe en effet plus de 190 Ag O (LPS), plus de 80 Ag K (antigène capsulaire) et 56 Ag H (flagelline). Les sérotypes correspondent à diverses associations de ces antigènes. Hormis les sérotypes responsables des gastro-entérites infantiles – souches ECEP –, dont la recherche peut être faite en routine pour les souches isolées de coproculture chez des enfants de moins de 3 ans, la sérotypie des autres souches est réservée à des laboratoires spécialisés.

La recherche de l'antigène capsulaire K1 devra être réalisée sur les *E. coli* isolés chez un nouveau-né afin d'alerter le clinicien sur le caractère hautement virulent de ces souches à tropisme méningé.

- **Détermination des ECEP.** C'est à partir du début des années 1950 que certains sérotypes d'*E. coli* ont été rendus responsables d'épidémies de gastro-entérites survenant chez des enfants de moins de 3 ans. Il existe en France une douzaine de sérotypes dits entéropathogènes, mais leur incidence a particulièrement chuté au cours des dernières décennies, ne nécessitant plus une surveillance par le Centre national de référence (CNR) des *E. coli*. La figure 30.4 résume la procédure d'identification. La technique est celle d'une agglutination sur lame qui doit apparaître en moins de 5 secondes et présenter un caractère massif.
- **Détermination des EHEC.** La majorité des EHEC isolés en France appartiennent au sérogroupe O157 (représentant 42 % des EHEC typés au CNR entre 2006 et 2010) et sont pour la plupart sorbitol négatif (des souches sorbitol positif circulent en Allemagne). L'utilisation du milieu de MacConckey permet ainsi de les repérer. D'autres sérogroupes émergent comme les O:26, les O:80 et les O:55 qui sont des sérogroupes habituellement associés aux EPEC. Ainsi, toute souche suspecte associée à un contexte de diarrhée sanglante ou de SHU devra être envoyée au CNR.

La détection des autres pathovars responsables de diarrhées reste du domaine des laboratoires spécialisés. Initialement fondée sur le pouvoir pathogène chez l'animal ou l'effet cytopathogène en culture cellulaire, l'identification de ces souches est actuellement réalisée par biologie moléculaire (voir Tableau 15.6).

Genre *Shigella*

Bien que faisant partie sur le plan génétique de l'espèce *Escherichia coli*, le genre *Shigella* a été conservé dans la taxonomie pour des raisons médicales. Ce genre comprend quatre « espèces » ou sous-groupes A, B, C, D pouvant comporter un ou plusieurs sérotypes : groupe A, *S. dysenteriae* avec une quinzaine de sérotypes ; groupe B, *S. flexneri* avec une dizaine de sérotypes ; groupe C, *S. boydii* avec une vingtaine de sérotypes ; et groupe D, *S. sonnei* avec un seul sérotype mais plusieurs biotypes (Tableau 30.5). De nouveaux sérotypes sont en cours de confirmation pour les trois premières espèces.

Pouvoir pathogène et habitat

S. dysenteriae type 1 ou bacille de Shiga est l'agent de la dysenterie bacillaire stricto sensu. Les autres *Shigella* provoquent des syndromes dysentériques. Il existe en fait de grandes variations dans la gravité des infections, la forme la plus grave étant due au bacille de Shiga.

Caractère d'identification

L'identification biochimique du genre *Shigella* pose principalement le problème du diagnostic différentiel avec une souche d'*E. coli* lactose négatif et immobile (voir Tableau 30.4). Le milieu à l'acétate de sodium de Trabulsi et

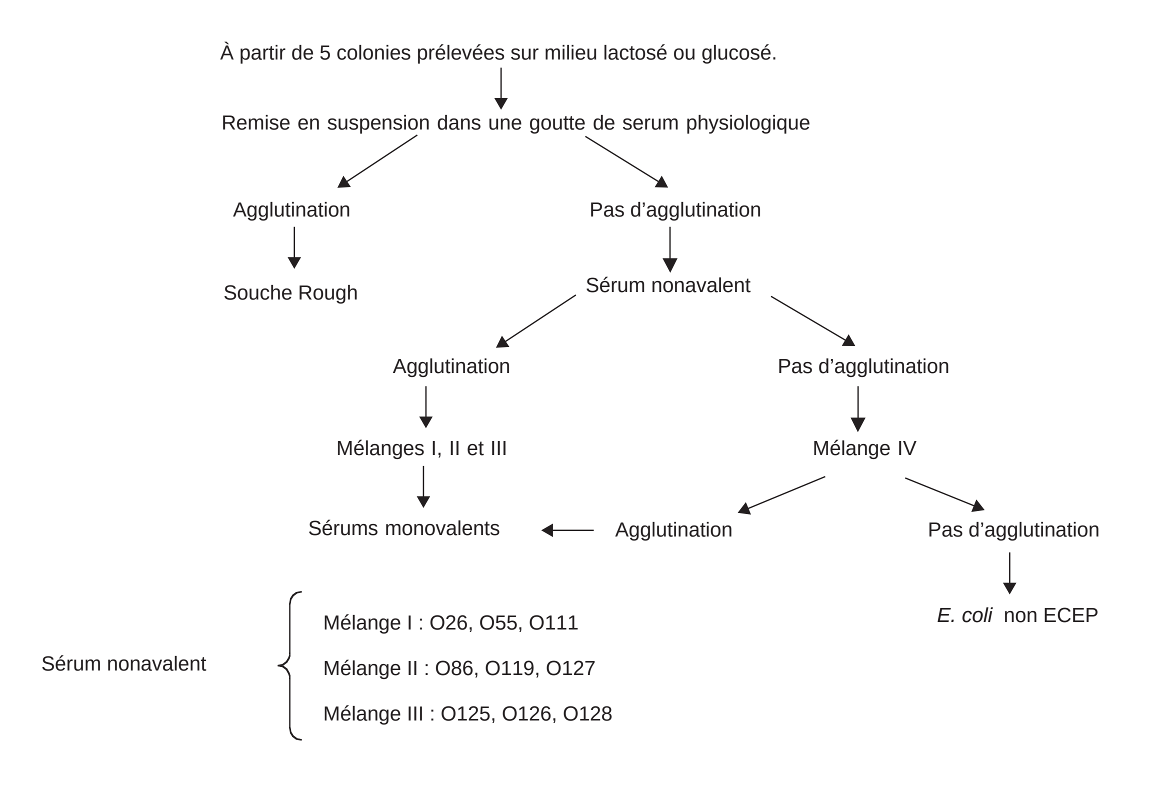


Fig. 30.4 Algorithme pour la détermination du sérotype d'un *Escherichia coli* entéropathogène (ECEP).

d'Ewing et le milieu au citrate de Christensen, qui sont d'une grande utilité en cas de doute, ne sont malheureusement plus commercialisés.

Les *Shigella* sont caractérisées par de nombreuses réactions négatives. L'origine de la souche – coproculture – est un élément d'orientation capital. Les problèmes d'identification se posent essentiellement avec les souches immobiles et agazogènes d'*E. coli* (voir Tableau 30.4).

S. dysenteriae type 1 est catalase négative, mais quelques souches d'autres types pourraient également être catalase négative. *S. dysenteriae* ne fermente jamais le mannitol contrairement aux trois autres espèces de *Shigella*.

Les cultures de *S. sonnei* dissocient fréquemment en deux phases, l'une lisse de type habituel pour une entérobactérie, l'autre mate à surface et contours irréguliers. *S. sonnei* ne produit jamais d'indole et peut être scindé en plusieurs biotypes selon trois caractères biochimiques dissociants (ONPG, xylose et rhamnose).

Des antisérums polyvalents (pour *S. flexneri, S. boydii* et *S. dysenteriae*) ou monovalents (pour *S. sonnei* et *S. dysenteriae* de type 1) sont commercialisés pour l'identification en routine des shigelles. Seul le CNR possède la gamme complète d'antisérums. Il convient d'adresser à ce CNR toutes les souches de *Shigella* isolées pour détermination complète du sérotype. Pour *S. sonnei*, comme il n'existe qu'un seul sérotype, on peut se contenter d'adresser l'information de l'isolement sans la souche en précisant si possible le biotype.

Genre *Salmonella*

Les hybridations ADN-ADN ont démontré que toutes les souches de salmonelles appartenaient à deux espèces, *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori* (ex-sous-espèce V). L'espèce *S. enterica* est divisée en six sous-espèces : *S. enterica* subsp. *enterica* (sous-espèce I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II) *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV), et *Salmonella enterica* subsp. *indica* (VI). Chacune de ces sous-espèces se divise en sérotypes (ou sérovars) définis par les antigènes O (LPS), H (flagelle) et Vi (capsule). La sous-espèce *S. enterica* subsp. *enterica* représente la très grande majorité des souches isolées chez l'homme et les animaux à sang chaud (> 95 %), les autres sous-espèces étant rencontrées principalement chez les animaux à sang froid. Au sein de cette sous-espèce I, plus de 1600 sérovars sont individualisés. Quatre de ces sérovars correspondent aux salmonelles dites « majeures » strictement humaines (Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B et Paratyphi C) responsables des fièvres typhoïde et paratyphoïdes. Les autres, dites « mineures », sont d'origine animale et/ou environnementale et sont responsables chez l'homme d'infections d'origine alimentaire sous forme de diarrhées fébriles dont la sévérité tient à la richesse de l'inoculum contaminant et de facteurs prédisposant à l'infection systémique (immunodépression, drépanocytose, etc.). Certains sérovars mineurs sont à l'origine d'épidémies nosocomiales dans les pays en développement. La plupart de ces sérotypes « mineurs » sont désignés par des noms géographiques (Wien, Dublin, etc.). Afin de simplifier la dénomination des sérotypes de salmonelle, il est usuel de juxtaposer le nom du sérotype à celui du genre *Salmonella*. Nous dirons donc *Salmonella* Typhi pour *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotype Typhi. Le tableau 30.6 indique les réactions différentielles entre

Tableau 30.5 Caractères différentiels des *Shigella*.

	Groupe A *S. dysenteriae*	Groupe B *S. flexneri*	Groupe C *S. boydii*	Groupe D *S. sonnei*
Nombre de sérotypes	15	10	20	1
Mannitol	–	+ (1, 2, 3, 5) ; d (4, 6)	+	+
Indole	+ (2, 7, 8) ou –	+ (5) ; d (1, 2, 3, 4) ou –	+ (5, 7, 9, 11, 13, 15) ou –	–
ODC	–	–	– ou + (13)	+
ONPG	+ (1, 6[1]) ou –	–	–	d[a]
Gaz en glucose	–	– ou d (6)	– ou d (14)	–
Dulcitol	– ou + (5)	– ou d (6)	+ (6, 10) ; d (3, 11, 12) ou –	–
Xylose	– ou + (8, 10)	– ou d (4)	+ ou – (2, 4, 9, 12, 13, 15)	d[b]
Rhamnose	– ou + (2, 7)	– ou d (3, 4)	– ou + (9)	d[c]
Agglutination anti-Shiga	+ (1) ou –	–	–	–
Anti-A	+ ou – 9, 10)[2]	–	–	–
Anti-B	–	+	–	–
Anti-C	–	–	+ ou – (12, 13)[2]	–
Anti-D	–	–	– ou + (6)	+

Toutes les souches sont immobiles, LDC, citrate de Christensen, acétate de Trabulsi, urée, TDA, H_2S, VP, malonate négatifs.
Les nombres entre parenthèses indiquent les sérotypes concernés par la réaction +, –, d indiquée.
[a, b, c] En fonction des biotypes : [a] = a et g + ; [b] = d + ; [c] = a et d +, f + ou + lent, g – ou + lent.
[1] Réaction tardive à 24 heures.
[2] Sérotypes rares non agglutinés par les réactifs commerciaux.

Tableau 30.6 Caractères différentiels entre le genre *Salmonella* et d'autres genres ou espèces pouvant être confondus.

	Salmonella	*Hafnia alvei*	*Citrobacter freundii*	*Proteus mirabilis*
H_2S	+[1]	–	+	+
LDC	+[2]	+	–	–
ONPG	–	+	+	–
Lyse par phage *Salmonella* O1	+85 à 98 %	–	–	–
Lyse par phage *Hafnia*	–	+96 %	–	–

[1] Sauf *S.* Paratyphi A et *S. Choleraesuis*.
[2] Sauf *S.* Paratyphi A.

les salmonelles et les espèces phénotypiquement proches, et le tableau 30.7 répertorie les principaux sérotypes.

Pouvoir pathogène et habitat

Du point de vue médical, il convient de distinguer deux grands groupes à l'intérieur du genre *Salmonella* :

- les salmonelles majeures, agents de fièvres typhoïde et paratyphoïdes – *S.* Typhi, *S.* Paratyphi *A*, *S.* Paratyphi B

Tableau 30.7 Liste et formule antigénique des principaux sérovars de salmonelles isolées en France.

	Antigène O	Antigène H	
		Phase 1	Phase 2
Groupe B (>50 % des isolements)			
S. Typhimurium	*1*, 4 (5), 12	i	1, 2
Variant monophasique de Typhimurium	*1*, 4 (5), 12	i	-
S. Saintpaul	*1*, 4, 12,*27*	e, h	1, 2
S. Heidelberg	*1*, 4,(5), 12	r	1, 2
S. Brandenburg	*1*, 4, 12	l, v	e, n, z15
S. Bredeney	*1*, 4, 12, 27	l, v	1, 7
S. Agona	*1*, 4, 12	f, g, s	–
S. Derby	*1*, 4, (5), 12	f, g	–
S. Paratyphi B (biotype Java)	*1*, 4, (5), 12	b	1, 2
S. Schwarzengrund	*1*, 4, 12, *27*	d	1, 7
S. Wien	*1*, 4, 12, *27*	b	l, w
S. Coeln	4, (5), 12	y	1, 2
S. Abortusovis	4, 12	c	1, 6
S. Stanley	*1*, 4, (5), 12, *27*	d	1, 2
S. Reading	*1*, 4, (5), 12	e, h	1, 5
S. Sandiego	4, (5) 12	e, h	e, n, x
Groupe C1–C2–C3 (~20 % des isolements)			
S. Paratyphi C	6, 7, (Vi)	c	1, 5
S. Choleraesuis	6, 7	c	1, 5
S. Infantis	6, 7	r	1, 5
S. Kentucky	8,20	i	z6
S. Bovismorbifians	6, 8	r	1, 5
S. Hadar	6, 7	z10	e, n, x
S. Newport	6, 8	e, h	1, 2
S. Virchow	6, 7	r	1, 2
S. Thompson	6, 7	k	1, 5
S. Montevideo	6, 7	g, m, s	–
S. Manhattan	6, 8	d	1, 5
S. Goldcoast	6, 8	r	l, w
S. Braenderup	6, 7	e, h	e, n, z15
S. Livingstone	6, 7	d	l, w

(*Suite*)

Tableau 30.7 **Suite.**

	Antigène O	Antigène H	
		Phase 1	Phase 2
S. Mbandaka	6, 7	z10	e, n, z15
S. Kottbus	6, 8	e, h	1, 5
S. Ohio	6, 7	b	l, w
S. Muenchen	6, 8	d	1, 2
S. Blockey	6, 8	k	1, 5
S. Tenessee	6, 7	z29	(1, 2, 7)
Groupe D (~20 % des isolements)			
S. Panama	*1*, 9 12	l, v	1, 5
S. Dublin	*1*, 9 12 (Vi)	g, p	–
S. Enteritidis	*1*, 9 12	g, m	–
S. Typhi	9, 12 (Vi)	d	–
S. Gallinarum-pullorum	*1*, 9 12	–	–
Groupe E (5 à 10 % des isolements)			
S. Senftenberg	1, 3, 19	g, s, t	–
S. London	3, 10	l, v	1, 6
S. Anatum	3, 10	e, h	1, 6
S. Give	3, 10	l, v	1, 7
Groupe G (<5 % des isolements)			
S. Kedougou	*1*, 13, 23	i	l, w
S. Worthington	*1*, 13, 23	z	l, w
S. Ibadan	13, 22	b	1, 5
S. Havana	*1*, 13, 23	f, g (s)	–
Groupe A (<1 % des isolements)			
S. Paratyphi A	*1*, 2, 12	a	–

Nombres en italique : facteur lié à la présence d'un bactériophage.
Nombres entre parenthèses : facteur facultatif.

d-tartrate négatif, *S.* Paratyphi C. Ces sérovars sont responsables de septicémies à point de départ lymphatique par envahissement des ganglions mésentériques. Le diagnostic de certitude repose sur l'isolement du germe surtout dans les hémocultures (en fonction des septénaires) ;

- les autres sérotypes « mineurs » habituellement responsables de toxi-infections alimentaires qui se manifestent par des gastro-entérites avec diarrhées fébriles et vomissements survenant dans les 24 à 72 heures suivant l'ingestion de l'aliment contaminant et dont l'évolution est en général spontanément favorable en quelques jours. Ces salmonelloses « mineures » peuvent cependant être responsables d'infections extradigestives (infections ostéoarticulaires, septicémies voire méningites) de type opportuniste sur certains terrains favorisants (drépanocytose, immunodépression, période néonatale). Le tableau 30.7 indique la liste des sérotypes les plus fréquents en France.

Identification

Identification biochimique

Comme pour toutes les *Enterobacteriaceae*, l'identification doit d'abord être biochimique, ce qui conduit pour les salmonelles au diagnostic de genre, d'espèce et de sous-espèce, puis par agglutination sur lame par immunsérums, ce qui amène pour les salmonelles au sérotype.

La plupart des salmonelles isolées dans un laboratoire de bactériologie le sont à partir de coprocultures après enrichissement puis utilisation de milieux sélectifs. Il est important de signaler que le bouillon Rappaport Vassiliadis (RVS) ou de Mueller-Kauffmann n'enrichit pas ou mal les salmonelles majeures. Il faut alors privilégier le bouillon de sélénite (malgré sa toxicité pour l'environnement). La galerie minimale d'orientation comporte classiquement trois tubes : milieu urée indole, milieu de Kligler, milieu mannitol mobilité.

Il est possible d'anticiper l'identification biochimique complète et de commencer le typage antigénique.

Il conviendra alors de donner les résultats sous réserve au clinicien, à la condition toutefois que le sérotype déterminé soit parmi les plus fréquemment isolés.

À l'exception du sérovar aviaire – *S.* Gallinarum-pullorum –, les salmonelles sont en général mobiles.

Quelques réactions sont particulièrement remarquables pour certaines souches importantes :

- *S.* Typhi est agazogène, ODC et citrate de Simmons négatifs, faiblement mobile à l'isolement, et sur milieu de Hajna elle produit en 24 heures une pointe d'H_2S très évocatrice ;
- *S.* Paratyphi A est le plus souvent H_2S, LDC et citrates de Simmons négatifs ;
- les autres salmonelles ubiquistes sont H_2S positif, LDC, ODC et citrate de Simmons positifs.

Les problèmes d'identification des salmonelles se posent en pratique courante avec certaines espèces : *Hafnia halvei* et *Citrobacter freundii*. Il peut exister des souches de *Salmonella* ayant acquis un plasmide métabolique lactose. Ces souches sont principalement isolées d'hémocultures car elles sont ignorées dans les coprocultures du fait de leur caractère lactose positif, comme le sont 75 % des salmonelles de la sous-espèce diarizonae (IIIb).

Le tableau 30.6 indique les principales réactions permettant de distinguer les salmonelles des autres espèces précitées. La lyse par les bactériophages spécifiques n'est plus pratiquée en routine.

Typage antigénique des *Salmonella*

Il s'agit de l'étape essentielle pour la détermination des sérotypes de salmonelles. Le typage repose sur la détermination des antigènes O (LPS), H (flagelle) et éventuellement Vi (capsule) de la souche.

Les salmonelles sont divisées d'abord en groupes sérologiques liés à la présence d'un facteur somatique O commun. Ces groupes anciennement dénommés par des lettres de A à Z sont désormais dénommés selon leurs antigènes O, de 2 à 67. À l'intérieur de ces groupes, les sérotypes individuels sont liés à la présence d'autres antigènes O accessoires, des antigènes flagellaire H (mono- ou biphasiques)

et de l'antigène Vi (uniquement et facultativement présent chez *S.* Typhi, *S.* Paratyphi C, *S.* Dublin, mais aussi chez des souches de *Citrobacter*).

Les formules antigéniques complètes de toutes les salmonelles sont répertoriées dans le schéma de Kauffmann-White-Le Minor, disponible à www.pasteur.fr/fr/sante/centres-collaborateurs-l-oms-ccoms/salmonella. Pour les nouveaux sérotypes, des addenda au schéma sont régulièrement publiés dans *Research in Microbiology* (ex-*Annales de Microbiologie* de l'Institut Pasteur).

Seuls les CNR sont en mesure de sérotyper les quelque 2600 sérotypes actuellement reconnus, ce qui nécessite une batterie de plus de 200 antisérums.

Une gamme minimale de sérums agglutinants commercialisés permet néanmoins une approche satisfaisante de la cinquantaine de sérotypes les plus fréquemment isolés en France. Seules les souches dont la détermination du sérotype est incomplète ou entrant dans un cadre d'investigation d'une toxi-infection collective ainsi que les souches de salmonelles « majeures » (*S.* Typhi et *S.* Paratyphi) seront adressées au CNR pour complément d'étude (sérotypage et sous-typage). Il est important de signaler que c'est sur la base volontaire d'envoi des souches au CNR que la détection de tout phénomène anormal se fait grâce à des outils algorithmiques hebdomadaires. Ainsi, l'alerte des épidémies de l'échelle départementale à nationale (voire internationale) se fait par le CNR aux autorités de santé, ceci afin de retirer l'aliment contaminé le plus rapidement possible.

L'attitude pratique générale est résumée ainsi :

- ne sérotyper que les souches identifiées biochimiquement ;
- la technique est une agglutination sur lame ;
- déterminer les antigènes O et l'éventuelle présence de Vi ;
- à l'intérieur du groupe sérologique O ainsi déterminé, rechercher les antigènes H mono- ou biphasiques compatibles avec les sérotypes de ce groupe ;
- si une seule phase H est décelée, pratiquer une inversion de phase selon la méthode de Sven Gard ;
- en cas de discrimination insuffisante avec la batterie d'antisérums utilisée, adresser les souches au CNR ;
- tout sérotype identifié au laboratoire peut être déclaré au CNR sous forme de fiche d'information.

Typages des antigènes somatiques O et de l'antigène Vi

Des sérums « mélanges » de dépistage permettent l'orientation vers certains sérogroupes. Ces sérums ont été appelés OMA, OMB, OMC jusqu'à OMF. L'agglutination est immédiate et massive. Il peut exister des réactions de coagglutination plus tardives et d'intensité moindre dans un ou plusieurs autres sérums. La présence de l'antigène Vi – antigène d'enveloppe – peut masquer l'agglutination O. Cet antigène Vi n'est présent que chez *S.* Typhi, *S.* Paratyphi C (souches rarissimes en France) et chez d'exceptionnelles souches de *S.* Dublin. En pratique, il n'y a que *S.* Typhi qui puisse être O inagglutinable par présence de Vi. Pour rendre les souches O agglutinables, il conviendra de chauffer une suspension de la souche 5 à 10 minutes à 100 °C ; l'antigène Vi passe dans le surnageant et l'antigène O sous-jacent devient accessible aux agglutinines O.

Compte tenu du fait que 98 % des souches isolées chez l'homme ont un antigène O correspondant aux sérums mélanges OMA et OMB, on commencera les agglutinations avec ces deux sérums et le sérum anti-Vi. Ce n'est qu'en l'absence d'agglutination avec ceux-ci que l'on testera la souche vis-à-vis des autres sérums « mélanges ».

Dans un deuxième temps, on pratiquera l'agglutination avec les sérums « monovalents » entrant dans la composition du sérum « mélange » et l'on déterminera ainsi le groupe antigénique voire le sous-groupe. Le tableau 30.8 indique la composition des sérums « mélanges ».

Typage des antigènes flagellaires ; inversion de phase

Les souches flagellées peuvent avoir des antigènes H mono- ou biphasiques, c'est-à-dire avec une ou deux spécificités H. Pour les souches biphasiques, les deux spécificités existent simultanément, mais une de ces spécificités est souvent prépondérante et l'on ne pourra détecter la seconde que par un artifice technique : l'inversion de phase selon Sven Gard. Cette inversion de phase consiste à inhiber la mobilité des bactéries sur lesquelles les flagelles ont une première spécificité grâce à l'antisérum dirigé contre cette spécificité. Les bactéries qui restent mobiles et qui peuvent envahir une gélose molle expriment alors la deuxième spécificité ou phase.

En pratique, on consultera le schéma de Kaufmann-White-Le Minor ou le tableau 30.7 pour les souches les plus fréquentes en France (voir également le site du CNR, www.pasteur.fr/cnr/salmonella). À l'intérieur du groupe antigénique O que l'on a déterminé, on cherchera quels antigènes H peuvent être présents. À l'aide des sérums H « mélange », on oriente le diagnostic de la phase H. Le tableau 30.9 indique la composition des sérums mélanges HM et des sérums « mélanges intermédiaires » en sérums monovalents.

Une fois la première phase H déterminée, on peut tenter de chercher la deuxième phase. Elle peut parfois être détectable d'emblée. En cas d'échec, il faudra pratiquer l'inversion de phase (Encadré 30.1).

La batterie minimale d'antisérums dont devrait disposer tout laboratoire de bactériologie est indiquée dans les tableaux 30.8 et 30.9. Cette batterie ne permet pas d'arriver au diagnostic exact de sérotype, mais constitue bien souvent une approche relativement satisfaisante.

La formulation de la réponse faite au clinicien dépendra donc en partie des possibilités de chaque laboratoire.

Par exemple, si l'on isole une souche de *Salmonella* OMA +, O:9, H:d, Vi avec un aspect typique sur milieu de Hajna, la seule réponse possible est *Salmonella* Typhi. En revanche, si la formule antigénique trouvée est OMA +, O 9 G, on ne peut qu'affirmer qu'il s'agit d'une salmonelle du groupe O:9 (anciennement D). Par ordre de fréquence pour un isolement fait chez l'homme en France, il s'agit vraisemblablement de *S.* Enteritidis O:9, H:g,m, beaucoup plus fréquente que *S.* Dublin O:9, H:g,p, ou que d'autres sérovars encore plus rares : *S.* Blegdam, *S.* Neastved, *S.* Rostock, *S.* Moscow, *S.* Newmexico ou *S.* Rosenberg. La réponse devra alors être : *S.* Enteritidis ; confirmation en cours.

Tableau 30.8 **Sérogroupes dépistés par les sérums mélanges et liste des sérums « monospécifiques » permettant la détermination précise du sérogroupe et des sous-groupes des salmonelles.**

Antigènes D Sérum mélange de dépistage	Sérum pour la détermination des groupes et sous-groupes	Groupe	Facteur O commun	Sous-groupe	Autres facteurs O ou VI pouvant être présents
OMA	1, 2	A	2		1[1], 12
	4, 5	B	4		1[1], 5, 12, 27
	9	D	9	D1 D2 D3	1[1], 12, Vi 46 1, 12, 46, 27
	3, 10, 15 10 15 1, 3, 19	E	3	E1 E2 E3 E4	10 15[1] 15[1], 34[1] 1, 19
OMB	6, 7, 8 7 8	C	6, 7 ou 6, 8 ou 8	C1 C2 C3 C4	6, 7, Vi 6, 8 8, 20[1] 6, 7, 14[1]
	11	F	11		
	13, 22, 23	G	13	G1 G2	1[1], 22 1[1], 23
	6, 14, 24	H	6, 14		1, 24, 25
OMC		I à K M à P	[2]		[2]
OMD		Q à W	[2]		[2]
OME		X à Z 51 à 53	[2]		[2]
OMF		54 à 59	[2]		[2]
OMG		60 à 63 65 à 67	[2]		[2]

Batterie de sérum minimale.
[1] Facteur lié à une conversion bactériophagique.
[2] Non précisé.

La souche devra être adressée au CNR qui confirmera et précisera le sérotype exact.

Il convient d'adresser à ce centre :

- toutes les souches non complètement identifiées ;
- toutes les souches de salmonelles majeures ;
- toutes les souches impliquées dans un cas groupé (déclaration obligatoire [DO]).

Il faut cependant notifier aussi au CNR tous les isolements dont on a pu faire le diagnostic de sérotype exact et complet.

On utilisera la fiche de renseignements fournie par ce CNR qui permet de collecter des informations importantes du point de vue épidémiologique (https://epidemio.pasteur.fr/salm-shig).

Sensibilité aux antibiotiques des *Salmonella* majeures et mineures

Le genre *Salmonella* est naturellement sensible à tous les antibiotiques. Cependant, depuis l'avènement des antibiotiques et de leur usage intensif en thérapeutique humaine et animale, les salmonelloses majeures et mineures deviennent de plus en plus difficiles à traiter.

Concernant *S.* Typhi, la résistance est principalement portée par un seul type de plasmide (incHI1) d'une seule population émergente dans le sous-continent indien (H58), avec une résistance aux classes « anciennes » d'antibiotiques comme le chloramphénicol, les aminopénicillines, le cotrimoxazole ou les tétracyclines, et une résistance de haut niveau aux fluoroquinolones liées à des mutations chromosomiques dans les gènes *gyrA* et *parC* codant pour l'ADN gyrase et la topo-isomérase IV, cibles des quinolones.

Concernant les *Salmonella* non typhiques résistantes aux antibiotiques, l'exemple le plus largement décrit est la propagation mondiale du clone de *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium de lysotype DT104 penta-résistant aux antibiotiques. Ce clone DT104 a intégré dans son chromosome un îlot génomique de 43 kb, le *Salmonella Genomic Island 1* (SGI1), dont une partie porte les différents gènes impliqués dans la résistance à l'ampicilline (A-*bla*$_{PSE-1}$), à la streptomycine et à la spectinomycine (S et Sp-*aadA1*), au chloramphénicol (C-*floR*), aux sulfamides (Su-*sul1*) et aux tétracyclines (Te-*tetG*). Une étude française portant sur un échantillon de souches reçues au CNR entre 1993 et 2003 a estimé que ce clone représentait 38,6 % des souches de Typhimurium en 1993, de 58 à 60 % de 1997 à 2002, et enfin 51 % en 2003, puis il s'est stabilisé autour des 40 % depuis 2005 mais présente une résistance additionnelle à l'acide nalidixique.

Tableau 30.9 **Composition des sérums mélanges et liste correspondante des sérums monovalents antiflagellaires disponibles (Diagnostics Pasteur).**

Antigènes H		Sérum mélange intermé-diaire	Sérum « monovalent » correspondant
Sérum mélange de dépistage	**Composition**		
HMA	a		a
	b		b
	c		c
	d		d
	i		i
	z10		z10
	z29		
HMB	e, h		e, h h
	e, n, x	HEn = e, n, x + e, n, z15	x z15
	G	HG = f, g + g, p + g, m, s + m, t	g, m g, p m p
HMC	k		k
	y		y
	z		z
	L	HL = l, v + l, w + l, z13+ L, Z28 + l, z40	v w
	Z4	HZ4 = z4, z23 + z4, z24 + z4, z32	
	r		r
HMD	z35 + z36 + z38 + z39 + z41 + z42 + z44 + z60		
HM III	z52 + z53 + z54 + z55 + z56 + z57 + z61		
H1		H1 = 1, 2 + 1, 5 + 1, 6 + 1, 7 + z6	2 5 6 7

Batterie de sérum minimale.

Genre *Citrobacter*

Actuellement, le genre *Citrobacter* comprend 11 espèces : *C. amalonaticus* (anciennement *Levinea amalonatica*), *C. braakii*, *C. farmeri*, *C. freundii*, *C. gillenii*, *C. koseri* (anciennement *C. diversus*), *C. murliniae*, C. *rodentium*, *C. sedlakii*, *C. werkmanii* et *C. youngae*.

Les espèces *C. braakii*, *C. freundii*, *C. gillenii*, *C. murliniae*, *C. rodentium*, *C. sedlakii*, *C. werkmanii* et *C. youngae* sont parfois rassemblées sous le vocable de « complexe *Citrobacter freundii* » ou de « *Citrobacter freundii sensu lato* ».

Encadré 30.1 Technique d'inversion de phase selon Sven Gard

À une gélose molle gardée en surfusion (10 ml de gélose nutritive + 20 ml de bouillon nutritif) ou à la gélose de Sven Gard, on ajoutera 1 goutte de sérum pour inversion de phase choisi pour contenir les anticorps de la première spécificité déterminée, ou 3 gouttes de sérum monovalent ou sérum mélange intermédiaire correspondant à la première phase détectée. On ensemencera cette gélose en touche centrale et on incubera la boîte sans la retourner 24 heures à 37 °C. On prélèvera ensuite la culture en périphérie de la zone d'envahissement, pour rechercher par agglutination la deuxième phase à l'aide des antisérums compatibles, en s'aidant du schéma de Kaufmann-White-Le Minor.

Pouvoir pathogène et habitat

Les bactéries du genre *Citrobacter* sont des saprophytes répandus dans l'environnement et sur la nourriture végétale. Elles colonisent l'intestin de l'homme et, chez des sujets prédisposés, elles peuvent être considérées comme potentiellement pathogènes, pouvant donner des infections principalement du tractus urinaire. Toutes les espèces, à l'exception de *C. rodentium*, peuvent être isolées de prélèvements cliniques chez l'homme ; elles sont considérées comme des bactéries pathogènes opportunistes et la plupart de ces infections sont d'origine nosocomiale. *C. koseri* a été isolé lors d'épidémies de méningites néonatales.

Identification

Le genre *Citrobacter* rassemble des entérobactéries mobiles (sauf *C. rodentium*), productrices d'H_2S, ONPG positive (rares souches négatives), LDC négative, phénylalanine désaminase négative, Voges-Proskauer négative.

C. diversus et *C. amalonaticus* peuvent être considérés en première approche comme des *Escherichia coli* citrate de Simmons positif. *C. freundii* pourrait être confondu avec les souches H_2S positif d'*E. coli*, mais il ne produit pas d'indole et ses cultures ainsi que celles de *C. koseri* ont une odeur particulièrement nauséabonde. Le tableau 30.10 indique les nombreux synonymes utilisés ainsi que les réactions différentielles entre ces espèces. Sur le plan de la sensibilité aux antibiotiques, *C. koseri* se distingue par la production d'une pénicillinase, alors que les espèces du « complexe *Citrobacter freundii* » produisent naturellement une céphalosporinase (voir Tableau 30.2), sauf *C. sedlakii* qui produit une β-lactamase naturelle proche des BLSE.

De nombreuses souches de *Citrobacter* spp. sont aptes à cultiver dans des milieux d'enrichissement comme les bouillons au sélénite et au tétrathionate et sur des géloses sélectives comme la gélose *Salmonella-Shigella*, la gélose désoxycholate citrate ou la gélose au vert brillant. Sur ces milieux sélectifs, les colonies n'acidifiant pas le lactose (ou acidifiant tardivement le lactose) et/ou produisant de l'hydrogène sulfuré peuvent être confondues avec des colonies de salmonelles,

Tableau 30.10 **Caractères différentiels des espèces du genre *Citrobacter*.**

	Citrobacter freundii	*Citrobacter koseri*	*Citrobacter amalonaticus*	*Citrobacter braaki*	*Citrobacter youngae*	*Citrobacter farmeri*	*Citrobacter gillenii*	*Citrobacter sedlakii*	*Citrobacter murliniae*	*Citrobacter rodentium*	*Citrobacter werkmanii*
Synonymes		*Levinea malonatica*, *Citrobacter intermedius* b, *Citrobacter diversus*	*Levinea amalonatica*, *Citrobacter intermedius* a, *Padlewskia*								
Mobilité	+	+	+	d	+	+	d	+	+	−	+
Croissance sur milieu au KCN	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	+
Indole	−	+	+	d	−	+	−	+	+	−	−
Citrate de Simmons	d	+	+	d	d	−	d	d	+	−	+
H_2S	d	−	−	d	d	−	d	−	d	−	+
Uréase	d	d	+	d	−	d	−	+	d	d	+
ODC	−	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−
Malonate	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+	+
Mélibiose*	+	−	−	+	−	+	d	+	d	−	−
Raffinose*	d	−	−	d	−	+	d	−	d	−	−
Saccharose*	d	d	−	d	d	+	d	−	d	−	−

* Acidification ; + : ≥ 90 % positif ; – : ≤ 10 % positif ; d : variable.

particulièrement avec celles des sous-espèces arizonae (IIIa) et diarizonae (IIIb). La majorité des souches de *Citrobacter* sp. cultivent abondamment sur le milieu cefsulodine-irgasan-novobiocine (CIN) en donnant des colonies à centre rouge et à bord translucide pouvant être confondues avec des colonies de *Yersinia*. Enfin, sur les milieux chromogènes détectant la présence de β-D-galactosidase, certains *Citrobacter* donnent une réaction positive pouvant les faire confondre avec *Escherichia coli*.

Genre *Edwardsiella*

Ce genre ne comporte qu'une seule espèce en bactériologie médicale : *Edwarsiella tarda*. Cette espèce, hôte de l'intestin des reptiles en région tropicale, est parfois isolée de coprocultures chez l'homme vivant dans ces mêmes régions. Un pouvoir entéropathogène est suspecté. Elle peut également se comporter comme pathogène opportuniste.

En première approche, lors des isolements à partir de selles, il s'agit d'une *Salmonella* indole positive. La résistance constante à la colistine est l'élément d'orientation majeur.

Genre *Kluyvera*

Les *Kluyvera* spp. sont retrouvées dans le sol, les eaux usées et les aliments. Il s'agit d'un genre de création récente qui était connu anciennement sous le nom de groupe entérique 8. Il existerait au moins trois espèces dont deux ont actuellement une dénomination précise : *K. ascorbata* et *K. cryocrescens*. Ces bactéries ont été isolées de prélèvements pathologiques divers, principalement urines et crachats, mais aussi de septicémies sur cathéters.

Sur le plan de la résistance aux β-lactamines, les espèces du genre *Kluyvera* produisent une BLSE naturelle exprimée à « bas niveau ».

Les problèmes d'identification de ce genre se posent avec certaines souches de *Citrobacter* spp. et de *Pantoea agglomerans*. Le tableau 30.11 indique les principaux caractères différentiels entre ces espèces.

Tableau 30.11 Caractères différentiels entre *Kluyvera* et autres espèces pouvant être citrate +, indole + et VP –.

	Kluyvera spp.	*Citrobacter koseri*	*Citrobacter amalonaticus*	*Pantoea agglomerans*
Indole	+	+	+	d
Citrate de Simmons	+	+	+	+
LDC	+	–	–	–
ODC	+	+	+	–
Malonate	+	+	–	d
Pigment jaune	–	–	–	d
Lactose	+	–	–	d
Mélibiose	+	–	–	d
Croissance sur milieu au KCN	+	–	+	d

Genres *Leclercia, Leminorella, Moellerella, Yokenella, Trabulsiella*

Leclercia adecarboxylata, *Leminorella grimontii*, *Leminorella richardii*, *Moellerella wisconsensis* et *Yokenella regensburgei* (anciennement *Koserella trabulsii*) sont rarement retrouvés dans les isolats humains et leur pouvoir pathogène reste discuté, sauf dans de rares cas où ils sont apparus comme des pathogènes opportunistes sur des terrains débilités. *Trabulsiella guamensis* a été rarement isolé de selles humaines en situation non pathogène et présente des caractères proches des salmonelles (mobile, lactose –, H_2S +), mais s'en différencie par l'ONPG positive, la résistance au phage O1 et l'absence d'agglutination avec les antisérums de salmonelles.

Groupe KES (entérobactéries VP +), tribu des *Klebsiellae*

Ce groupe hétérogène sur le plan taxonomique rassemble ce que l'on nomme généralement les entérobactéries VP +, quoique ce caractère ne soit pas obligatoire au sein de cette tribu et puisse exister dans d'autres genres comme *Yersinia*, ou espèces comme *Proteus mirabilis*. Au sein de ce groupe, on différencie sur le plan phénotypique les genres immobiles, « groupe des *Klebsiella* » (genres *Klebsiella* et *Raoultella*) ; les genres mobiles et sensibles à la colistine, « groupe des *Enterobacter* » (genres *Enterobacter, Hafnia* et *Pantoea*) ; et les genres mobiles et résistants à la colistine (*Serratia, Cedecea*). D'autres genres tels que *Erwinia, Ewingella, Rahnella* sont exceptionnellement isolés de prélèvements humains. Le tableau 30.12 donne les caractères différentiels de ces genres.

Genres *Klebsiella* et *Raoultella*

Le genre *Klebsiella* est composé de quatre espèces et sous-espèces : *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* et *K. oxytoxa*. Les résultats des hybridations ADN-ADN montrent que *K. ornithinolytica*, *K. planticola* et *K. terrigena* forment un groupe distinct et sont reclassées au sein du nouveau genre *Raoultella* (*R. ornithinolytica*, *R. planticola*, *R. terrigena*). Les caractères communs de ces deux genres sont l'absence de mobilité, la réaction de VP positive (sauf chez *K. pneumoniae* subsp. *ozaena* et *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*), les réactions de TDA et d'ADH négatives ainsi qu'une forte activité sur les sucres. En galerie API 20E®, toutes ces espèces sont gélatinase négative, bien qu'environ 80 % des souches de *K. oxytoca* possèdent une gélatinase en général peu active, et par conséquent non détectée. Les caractères distincts entre espèces sont indiqués dans le tableau 30.13.

Sur le plan de la sensibilité aux antibiotiques, toutes sont sensibles naturellement à la colistine et produisent une pénicillinase de type SHV (voir Tableau 30.2).

Pouvoir pathogène et habitat

K. pneumoniae subsp. *rhinoscleromatis* peut être responsable du rhinosclérome ; il s'agit d'un épaississement chondroïde

Tableau 30.12 **Caractères différentiels des genres de la tribu des *Klebsiellae*.**

	Klebsiella, Raoultella	*Enterobacter Cronobacter*	*Hafnia alvei*	*Pantoea agglomerans*	*Serratia*	*Cedecea*
Mobilité à 37 °C	–	+	d	d	+	+
Mobilité à 20 °C	–	+	+	+	+	+
Sensibilité à la colistine	+	+	+	+	–	–
Pigment rouge	–	–	–	–	d	–
Pigment jaune	–	–[3]	–	d	–	–
ADH	–[1]	d	–	–	–	+
ODC	–[2]	+	+	–	d	d
LDC	d	d	+	–	d	–
Uréase	d	d	–	–	–	–
VP à 37 °C	d	d	d	d	d	d
VP à 22 °C	d	d	+	d	+	d

Toutes les espèces sont H_2S et TDA négatives. d : variable
[1] Sauf certaines souches de *K. pneumoniae* subsp. *ozenae*.
[2] Sauf *R. ornithinolytica*.
[3] Sauf *Cronobacter*.

Tableau 30.13 **Caractères différentiels des espèces des genres *Klebsiella* et *Raoultella*.**

	K. oxytoca	*K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*	*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*	*K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*	*R. ornithinolytica*	*R. planticola*	*R. terrigena*
ONPG	+	+	+	–	+	+	+
LDC	+	d	+	–	+	+	+
ODC	–	–	–	–	+	–	–
Citrate de Simmons	+	d	+	–	+	+	+
Uréase	+	d	+	–	+	+	d
Indole	+	–	–	–	+	d	–
VP	+	–	+	–	d	+	+
Inositol*	+	d	+	+	+	+	+
Sorbitol*	+	d	+	d	+	+	+
Rhamnose*	+	d	+	+	+	+	+
Saccharose*	+	d	+	+	+	+	+
Mélibiose*	+	+	+	d	+	+	+

Tous sont immobiles et acidifient de nombreux sucres (glucose, mannitol, amygdaline, arabinose).
* Acidification.

des muqueuses labioglossopharyngées. *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* est responsable de l'ozène qui associe rhinite atrophique fétide et des processus destructifs des bronches.

K. pneumoniae subsp. *pneumoniae* et *K. oxytoca* sont isolées principalement dans les infections urinaires ou respiratoires parfois compliquées de septicémies, surtout en milieu hospitalier où elles seraient responsables de 10 % des infections nosocomiales.

Identification

L'aspect des cultures est en général très florissant : colonies grasses de 3 à 4 mm de diamètre en 24 heures pour *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* et *K. oxytoca* ; plus tardivement – 48 à 72 heures – pour *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* et *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*. La présence d'une capsule rend les colonies muqueuses, parfois filantes. La capsule est favorisée par des milieux saccharosés tel le milieu de Worfel-Ferguson. Il existe plus de 70 sérotypes capsulaires. Le typage est réalisé par diverses techniques (de Neufeld, précipitation in situ ou « gonflement capsulaire »), contre-immunoélectrophorèse. En dehors de l'intérêt épidémiologique, ce typage est surtout important pour l'identification de *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* et de *K. pneumoniae* subsp. *ozenae*. Des systèmes de biotypage sont également adaptés aux *Klebsiella*. Tous ces systèmes de typage ont tendance à être abandonnés au profit d'une approche MLST ou séquençage complet du génome.

Quelques variants uréase négative de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* et *K. oxytoca* existent. L'expression de l'uréase est favorisée après croissance sur milieu de Worfel-Ferguson. D'autres variants de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* – dits dystrophiques – peuvent se rapprocher de *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* et sont caractérisés par l'utilisation d'un nombre moindre de substrats que les *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* classiques ou « eutrophiques ».

Genres *Enterobacter*, *Cronobacter*, *Hafnia* et *Pantoea*

Le genre *Enterobacter* est composé de très nombreuses espèces dont les principales retrouvées dans les prélèvements humains sont : *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. gergoviae*, *E. asburiae*, *E. amnigenus*, *E. cancerogenus*. *E. cloacae* ne peut être distingué sur le plan biochimique d'*E. hormaechei*, qui peut aussi être retrouvé dans des prélèvements cliniques, comme l'ont montré les études portant sur l'identification bactérienne par spectrométrie de masse. La proximité génétique d'*E. aerogenes* avec le genre *Klebsiella* a amené certains bactériologistes à proposer pour cette espèce le nom de *Klebsiella mobilis*. Trois nouveaux genres, *Cronobacter*, *Hafnia* et *Pantoea*, ont été créés pour les espèces *Cronobacter sakazakii* (anciennement *Enterobacter sakazakii*), *Hafnia alvei* (anciennement *Enterobacter hafniae*) et *Pantoea agglomerans* (anciennement *Enterobacter agglomerans* et *Erwinia herbicola*). En dehors de *Pantoea agglomerans*, d'autres espèces sont décrites au sein du genre *Pantoea*, mais ce sont, comme les authentiques *Erwinia*, des phytopathogènes pratiquement jamais isolés chez l'homme. De même, le nouveau genre *Cronobacter* créé pour l'espèce *Enterobacter sakazakii* comporte au moins cinq espèces proches (*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*).

Pouvoir pathogène et habitat

Les *Enterobacter*, présents dans l'environnement, sont également des commensaux du tube digestif. Ce sont des pathogènes opportunistes responsables, en milieu hospitalier surtout, d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses. *Cronobacter sakazakii* a, de plus, été responsable de méningites chez des nouveau-nés nourris au biberon avec des laits en poudre contaminés.

Pantoea agglomerans étant une bactérie phytopathogène du milieu extérieur, la source de contamination des malades devra être recherchée dans l'environnement.

Identification

L'aspect morphologique en culture est celui d'une entérobactérie typique. *Cronobacter sakazakii* et certaines souches de *Pantoea agglomerans* produisent de plus un pigment jaune caractéristique. Le tableau 30.14 indique les différentes réactions permettant la différenciation des principales espèces.

Genre *Serratia*

Ce genre comporte actuellement dix espèces : *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. rubidea*, *S. plymuthica*, *S. odorifera*, *S. fonticola*, *S. grimesii*, *S. proteamaculans*, *S. ficaria* et *S. entomophila*. Le tableau 30.15 résume les caractères différentiels entre ces espèces.

Tableau 30.14 **Caractères différentiels des principales espèces du genre *Enterobacter* et des espèces anciennement rattachées.**

	E. cloacae	*E. aerogenes*	*E. gergoviae*	*Cronobacter. sakasakii*	*E. asburiae*	*E. amnigenus*	*E. cancerogenus*	*Pantoea. agglomerans*	*Hafnia alvei*
VP	+	+	+	+	–	+	+	d	+ à 22 °C d à 37 °C
Mobilité	+	+	+	+	+	+	+	d	+ à 22 °C d à 37 °C
Pigment jaune	–	–	–	+	–	–	–	d	–
Uréase	–	–	+	–	–	–	–	–	–[1]
LDC	–	+	d	–	–	–		–	+
ODC	+	+	+	+	+	+	+	–	+
ADH	+	–	–	+	d	d	d	–	–
Citrate de Simmons	+	+	+	+	+	d	–	+	– (+ en 3 j)
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+ à 22 °C d à 37 °C
Sorbitol	+	+	–	–	+	d	–	d	–
Raffinose	+	+	+	+	+	d		d	–
Croissance Sur milieu Au KCN	+	+	–	+	+	+	+	d	+

[1] Quelques souches +.

Pouvoir pathogène et habitat

Ce sont toutes des bactéries du milieu extérieur. Elles se comportent comme des pathogènes opportunistes avec un double tropisme : arbres respiratoire et urinaire. *S. marcescens* est l'espèce la plus fréquente au sein de ce genre – 90 % des isolements humains –, suivie de *S. liquefaciens*, puis *S. rubidea*. Les autres espèces sont beaucoup plus rares et *S. entomophila* n'a pas été retrouvée chez l'homme.

Identification

Certaines souches de *S. marcescens* et la plupart des souches de *S. plymuthica* et de *S. rubidaea* élaborent un pigment insoluble dans l'eau, non diffusible, lié aux enveloppes cellulaires et connu sous le nom de prodigiosine. Ce pigment confère aux colonies des souches productrices une coloration rouge-violet. Sa formation est favorisée par une culture effectuée à 30 °C sur un milieu pauvre tel que l'agar au glycérol (peptone : 5 g, glycérol : 10 ml, agar : 20 g, eau distillée : 1000 ml). C'est un des caractères le plus indicatif – quand il est présent – et qui fut responsable des miracles des « hosties sanglantes ». Les cultures de *S. ficaria*, de *S. odorifera* et de quelques souches de *S. rubidaea* ont une odeur de sous-bois ou « odeur végétale » alors que les cultures des autres espèces ont une odeur rappelant le poisson ou l'urine.

Toutes les *Serratia* possèdent une gélatinase et une DNAse (sauf *S. fonticola*) et sont résistantes à la colistine. Cette résistance, parfois mieux mise en évidence à 22 °C, se présente souvent avec le phénomène de la cocarde sur l'antibiogramme; la bactérie se développe jusqu'au bord du disque avec un anneau d'inhibition paradoxale à distance (Fig. 30.5). La plupart des espèces du genre *Serratia* produisent de plus

Tableau 30.15 Caractères différentiels des principales espèces du genre *Serratia.*

	S. marcessens	*S.liquefaciens* *S. proteamaculans*	*S. rubidaea* *S. marinorubra*	*S. plymuthica*	*S. odorifera*	*S. fonticola*	*S. ficaria*
VP	+	+ à 22 °C d à 37 °C	+	+	+	–	d
LDC	+	+	d	–	+	d	–
ODC	+	+	–	–	d	+	–
Indole	–	–	–	–	+	–	–
Pigment rouge	d	–	+	d	–	–	–
Malonate	–	–	+	–	–	+	–
L-arabinose*	–	+	+	+	+	+	+
L-rhamnose*	–	d	–	–	+	+	d
Raffinose*	–	+	+	+	d	+	d
Odeur végétale	–	–	d	–	+	–	+

* Acidification.

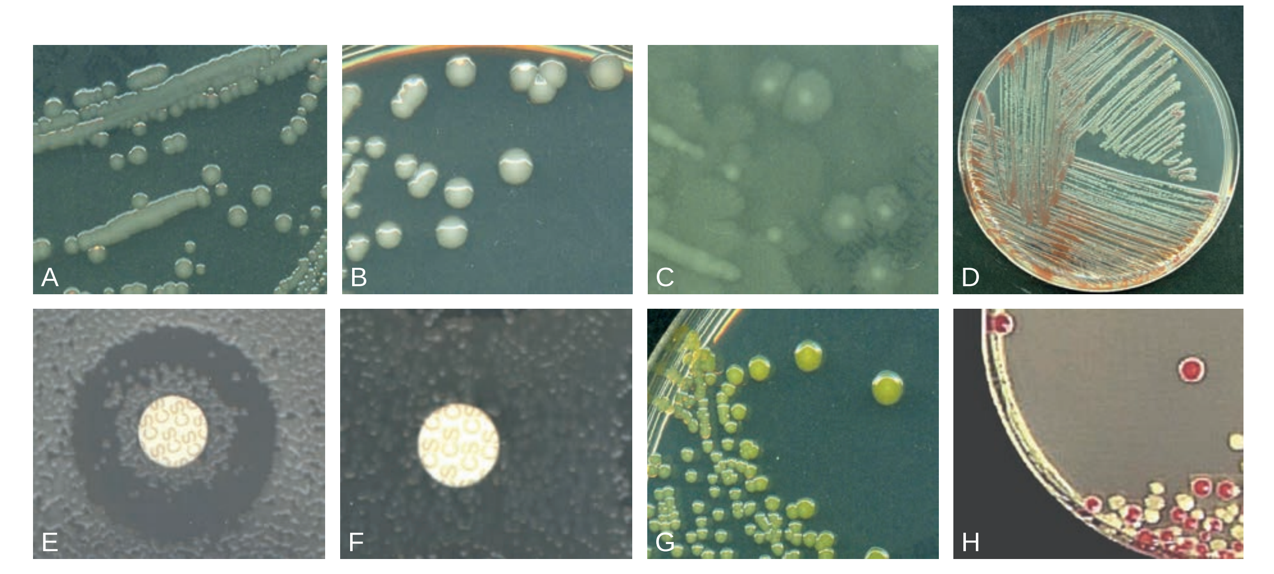


Fig. 30.5 Aspect des cultures des différentes espèces d'entérobactéries sur gélose ordinaire. A. *Escherichia coli* : aspect classique des colonies d'entérobactéries. **B.** *Klebsiella pneumoniae* : colonies muqueuses. **C.** *Proteus mirabilis* : envahissement de la gélose en voile ou vagues autour des colonies isolées (essaimage). **D.** *Serratia marcescens* : expression du pigment rouge (prodigiosine) avec effet « *Quorum-sensing* ». **E.** *Serratia marcescens* : résistance à la colistine avec aspect en « cocarde ». **F.** *Proteus mirabilis* : résistance contact à la colistine. **G.** *Enterobacter sakasakii* : production d'un pigment jaune. **H.** *Serratia marcescens* : double population dont l'une produit un pigment rouge (prodigiosine)

une céphalosporinase naturelle. *S. fonticola* produit une β-lactamase naturelle proche des BLSE.

Genre *Cedecea*

Il s'agit d'un nouveau genre comportant au moins cinq espèces dont trois ont reçu un nom : *C. davisae*, *C. lapagei* et *C. neteri*.

Les espèces du genre *Cedecea* ont rarement été retrouvées comme pathogènes opportunistes chez des patients immunodéprimés.

Le genre *Cedecea* se caractérise essentiellement par sa résistance à la colistine mais, à l'inverse des *Serratia*, il possède une ADH et ne possède pas de DNAse. Les souches sont indole, gélatinase, TDA, H_2S négative, ONPG et citrate de Simmons positifs.

Genres *Rahnella* et *Ewingella*

Ces deux genres représentés chacun par une seule espèce (*Rahnella aquatilis* et *Ewingella americana*) sont des germes de l'environnement exceptionnellement retrouvés chez l'homme. *Rahnella aquatilis* a été retrouvé comme pathogène opportuniste chez des immunodéprimés. Le rôle pathogène d'*Ewingella* est plus discutable.

Tribu des *Proteae* (entérobactéries TDA +)

La tribu des *Proteae* comporte actuellement trois genres :

- le genre *Proteus* avec trois espèces principales : *P. mirabilis*, *P. vulgaris* et *P. penneri*. Les nouvelles espèces *P. hauseri* et *P. myxofaciens* n'ont pas été retrouvées chez l'homme ;
- le genre *Providencia* avec trois espèces principales : *P. alcalifaciens*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*. Les nouvelles espèces *P. rustigianii* et *P. heimbachae* sont rarement retrouvées chez l'homme ;
- le genre *Morganella* qui ne compte qu'une seule espèce : *M. morganii*.

Le nouveau genre *Tatumella* possède, comme les *Proteae*, une tryptophane désaminase. Il possède par ailleurs un certain nombre de traits caractéristiques qui le mettent en marge de la tribu des *Proteae* et même de la famille des *Enterobactriaceae*. Il sera donc étudié à part.

L'ensemble des caractères de la tribu sont rassemblés dans le tableau 30.16.

Genres *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*

Pouvoir pathogène et habitat

Ce sont toutes des bactéries pathogènes opportunistes. Néanmoins, une distinction doit être faite entre *P. mirabilis* et les autres membres de la tribu. En effet, si *P. mirabilis* est souvent isolé d'infections du tractus urinaire chez des malades « ambulatoires », les autres appartiennent aux germes « hospitaliers » mineurs causant souvent de petites épidémies d'infections urinaires sur sonde dans les services de soins intensifs ou de gériatrie. La distinction porte aussi sur la sensibilité aux antibiotiques. *P. mirabilis* ne produit pas de β-lactamase naturelle, mais près de la moitié des souches expriment une pénicillinase d'origine plasmidique ou chromosomique portée par l'îlot génomique SGI1 décrit chez *Salmonella* Typhimurium. *P. vulgaris* et *P. penneri* possèdent une β-lactamase particulière parfois dénommée « céfuroximase » qui rend ces espèces résistantes aux pénicillines du groupe A et aux céphalosporines de 1re et 2e générations (à l'exception des céphamycines comme la céfoxitine), mais dont l'activité enzymatique est inactivée par l'acide clavulanique. Les genres *Providencia* et *Morganella* produisent une céphalosporinase naturelle (voir Tableau 30.2).

Tableau 30.16 **Caractères différentiels de la tribu des *Proteae*.**

	Proteus			*Providencia*			*Morganella morganii*
	mirabilis	*vulgaris*	*penneri*	*alcalifaciens*	*stuartii*	*rettgeri*	
Uréase	+	+	+	–	d[1] (15 % +)	+	+
Indole	–	+	–	+	+	+	+
H_2S	+	+	d	–	–	–	–
Citrate de Simmons	d	d	–	+	+	+	–
Gaz en glucose	+	+	+	d[2]	–	Trace	+
Mannitol	–	–	–	–	d	+	–
Adonitol	–	–	–	d[2]	–	+	–
Inositol	–	–	–	–	+	+	–
Tréhalose	+	d	d	–	+	–	d
ODC	+	–	–	–	–	–	+
Gélatinase	+	+	d	–	–	–	–

Tous sont TDA +, résistants à la colistine, ONPG, lactose, malonate, VP, LDC et ADH négatifs (sauf rares souches ONPG + ou lactose + par acquisition de plasmides métaboliques).

[1] Caractères d'origine plasmidique.

[2] Suivant le biotype.

Identification

Certains aspects morphologiques et culturaux peuvent être très indicatifs pour certaines espèces. *P. mirabilis* et *P. vulgaris* ont un aspect très polymorphe au Gram avec des formes longues. Ces deux espèces sont abondamment flagellées et donnent sur milieu ordinaire un envahissement du milieu ou essaimage.

Il n'y a que très peu de problèmes d'identification au sein de cette tribu en dehors de souches qui ont acquis un plasmide lactose et de celles qui ont perdu l'enzyme de définition de la tribu : la TDA. La résistance à la colistine est alors la réaction d'orientation essentielle. La spectrométrie de masse différencie parfois difficilement l'espèce *Proteus penneri* de *Proteus vulgaris* dont elle est proche ; la distinction peut se faire sur son caractère non indologène.

Genre *Tatumella*

Ce genre de création récente ne comporte qu'une seule espèce, *Tatumella ptyseos* (anciennement groupe EF9).

Pouvoir pathogène et habitat

Cette bactérie a été essentiellement isolée d'expectorations mais aussi d'hémocultures. Elle se comporterait comme un pathogène opportuniste.

Identification

T. ptyseos occupe une place particulière au sein des *Enterobacteriaceae*. Elle en possède les caractères de définition sauf pour le type de flagellation, *T. ptyseos* ne possédant souvent qu'un seul flagelle, et il est en pratique immobile à 37 °C et peu mobile à 25 °C. Sa température optimale de croissance et de 25 °C. Elle présente certains caractères communs avec les *Proteae* : TDA +, ONPG –, lactose –. En outre, elle donne une réponse négative aux tests indole, urée, LDC, ODC, ADH, H_2S, gélatinase et positive à la réaction de Voges-Proskauer. Elle est sensible à la colistine mais surtout à la pénicilline G, caractéristique tout à fait remarquable au sein des *Enterobacteriaceae*.

Tribu des *Yersiniae*

Le genre *Yersinia* regroupe des bacilles droits, parfois coccobacillaires de 0,5 à 0,8 µm × 1 à 3 µm à Gram négatif présentant parfois une coloration bipolaire, non capsulés, non sporulés, immobiles à 37 °C et pour certaines espèces mobiles à 30 °C. Les bactéries appartenant à ce genre ont un développement optimal vers 30 à 32 °C, mais une virulence ne s'exprimant qu'à 37 °C.

Les *Yersinia* sont actuellement rattachées aux *Enterobacteriaceae* avec les caractères oxydase négative, catalase positive, aéro-anaérobies facultatifs, fermentation du glucose et le plus souvent réduction des nitrates en nitrites.

Ce genre comporte actuellement trois espèces pathogènes principales : *Y. pestis, Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*.

Pouvoir pathogène et habitat

Y. pestis est responsable de la peste. Le couple puce–rongeur constitue le réservoir, mais la bactérie survit plusieurs mois dans le sol ou les terriers. La puce transmet *Y. pestis* de rongeur à rongeur et accidentellement des rongeurs à l'homme. À partir de la piqûre, la multiplication bactérienne entraîne une nécrose tissulaire puis un bubon ou adénite pesteuse qui siège le plus souvent au niveau de l'aine, plus rarement au cou ou à l'aisselle, localisation dépendant du siège de la porte d'entrée. La bactérie se dissémine précocement par voie lymphatique, provoquant la peste bubonique précédant parfois des formes septicémiques et pulmonaires. La transmission interhumaine est possible par les sécrétions bronchopulmonaires provoquant des pestes pulmonaires primitives. La contamination par aérosols est possible dans les laboratoires ou dans un contexte bioterroriste. La transmission interhumaine respiratoire se fait si la distance est inférieure à 2 mètres. Sur ces 20 dernières années, une vingtaine de pays ont notifié plus de 30 000 cas de peste. Les gènes de virulence sont essentiellement plasmidiques et les facteurs produits permettent une multiplication extracellulaire efficace et une inhibition du système immunitaire. La virulence de *Y. pestis* explique que le pronostic vital est engagé, tout particulièrement dans les formes pulmonaires ; certaines formes foudroyantes entraînent la mort en quelques heures. Le bacille de la peste peut persister plusieurs années dans le sol sans perdre sa virulence. Il peut donc recontaminer les rongeurs.

Y. pseudotuberculosis a pour réservoir le sol ; l'homme se contamine par contact direct avec des animaux proches de l'homme (chat, rongeurs « domestiques ») qui éliminent la bactérie dans leurs fèces, voire par ingestion d'aliments souillés.

Y. enterocolitica a un réservoir très vaste : environnement (eaux, sols), ou animaux (rongeurs, porcs, etc.), avec souches adaptées ou non à des espèces animales voire à l'homme. Ainsi, les biovars 4 (sérogroupe O:3), 3 (O:5) et 2 (O:9) sont les plus fréquents chez l'homme en Europe.

La contamination se fait essentiellement par voie digestive, exceptionnellement par contact ou griffure de chat.

Y. pseudotuberculosis et *Y. enterocolitica* sont responsables des yersinioses, infections qui se présentent sous formes digestives (adénolymphite mésentérique, plus rarement iléite chez les grands enfants ou les adultes, gastro-entérites fébriles chez les enfants de moins de 6 ans), septicémiques sur terrain fragilisé, ou extradigestives.

Y. enterocolitica est responsable d'entérocolite chez le jeune enfant, d'adénite mésentérique chez l'adolescent et l'adulte jeune. Les formes septicémiques sont plus rares et surviennent sur un terrain fragilisé, immunodéprimé, et des manifestations cliniques variées ont été décrites (abcès profonds, endocardite, méningite, etc.).

À noter la possibilité de choc septique lors d'une transfusion de globules rouges ou de plaquettes, *Y. enterocolitica* étant en effet capable de se multiplier à 4 °C.

Y. pseudotuberculosis est surtout responsable d'adénite mésentérique.

Une arthrite réactionnelle (surtout chez les sujets HLA B27) ou un érythème noueux sont assez communs au décours d'une infection à *Yersinia*.

Identification

Prélèvements

Pour la peste, il faut rappeler que la culture doit être pratiquée dans une unité de haute sécurité (P3 ou P4). La recherche s'effectue à partir de ponction de bubon, d'expectorations,

voire d'hémocultures ; en post mortem, on réalise les mêmes prélèvements et on pratique en plus des mises en culture de prélèvements hépatiques, spléniques et pulmonaires.

Pour les yersinioses non pesteuses, la recherche est réalisée sur selles ou ganglions mésentériques. La découverte de *Yersinia* dans des hémocultures ou autres prélèvements est fortuite (hors produits sanguins avec recherche classique de *Y. enterocolitica*).

Y. enterocolitica peut persister dans les selles plusieurs semaines après la guérison et peut aussi être retrouvé dans les selles dans les cas d'atteintes articulaires ou d'érythème noueux, ce qui n'est pas le cas pour *Y. pseudotuberculosis*.

Transport

Pour *Y. pestis*, les prélèvements doivent être conservés à basse température (4 °C) voire ensemencés sur place en milieu de transport de Carry Blair.

Pour les autres *Yersinia*, le transport doit s'effectuer également au froid ; ce procédé peut constituer un moyen d'enrichissement.

Examen direct

Y. pestis est un petit bacille à Gram négatif pléiomorphe à coloration bipolaire que l'on peut voir sous forme capsulée sur frottis d'organe ; on le recherche de préférence avec la coloration de Wayson.

Les autres *Yersinia* ont une morphologie comparable, avec pour *Y. pseudotuberculosis* une coloration bipolaire plus marquée que pour *Y. enterocolitica*.

Culture

Y. pestis se développe sur milieux gélosés usuels Drigalski, MacConkey, etc., et sur milieu sélectif CIN (cefsulodine, irgasan, novobiocine). La température optimale est de 25 à 28 °C et les colonies n'apparaissent le plus souvent qu'en 48 heures sur milieu gélosé. Les hémocultures doivent être conservées 4 à 5 jours à 25 °C. En milieu liquide, le trouble est inhomogène avec un voile en surface et un aspect floconneux en profondeur.

Un des caractères importants est l'immobilité à 22 °C comme à 37 °C par manque de ciliature. La galerie « entérobactéries » doit être incubée à 28 °C, sauf pour uréase et ONPG, recherchées à 37 °C. Les caractères biochimiques différentiels sont indiqués dans le tableau 30.16a. On distingue trois biotypes chez *Y. pestis* (Tableau 30.16b), biotypes ayant des répartitions historiques et géographiques différentes.

Le diagnostic différentiel entre *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* est parfois délicat (90 % d'homologie) et requiert l'étude de la séquence nucléotidique du gène *rpoB*. À noter que, récemment, un test immunochromatographique a été développé ; il est rapide (10 minutes), simple (réalisable au lit du patient), applicable aux prélèvements humains (liquides de bubon, expectorations), avec des performances comparables à la culture. Il est réservé bien sûr aux zones d'endémie.

La recherche de marqueurs épidémiologiques (sérotypie, lysotypie, ribotypage, etc.) est du domaine de laboratoires spécialisés, de même que la recherche de facteurs de pathogénicité.

Pour les autres *Yersinia*, on peut, pour les prélèvements polymicrobiens (selles, aliments, etc.), tenter un enrichissement durant plusieurs jours ou semaines à basse température (+ 4 °C) en milieu liquide (eau peptonée, tampon PBS).

Soit directement, soit à partir du milieu liquide d'enrichissement, on va, pour les selles, utiliser des milieux sélectifs pour coproculture, incubés à 30 °C :

- milieux contenant des sels biliaires (MacConkey, Hektoen, Wauters, SS, DCL) ;
- milieu sélectif cefsulodine, irgasan, novobiocine (CIN).

Tableau 30.16a **Caractères différentiels des espèces du genre Yersinia.**

Caractères/Espèces	*Y. pestis*	*Y. pseudo tuberculosis*	*Y. entero colitica*	*Y. intermedia*	*Y. frederiksenii*	*Y. kristensenii*	*Y. nuckeri*
Mobilité 25 °C	–	+	+	+	+	+	d
Lysine-décarboxylase	–	–	–	–	–	–	+
Ornithine-décarboxylase	–	–	+	+	+	+	+
Uréase	–	+	+	+	+	+	–
Citrate de Simmons (25 °C)	–	–	–	+	d	–	+
Voges-Proskauer (25 °C)	–	–	±	+	+	–	d
Production indole	–	–	d	+	+	d	–
γGT	–	d	+	+	+	+	+
Acidification							
Rhamnose	–	+	–	+	+	–	–
Saccharose	–	–	+	+	+	–	–
Glucoside	–	–	–	+	–	–	–
Sorbitol	–	–	+	+	+	+	–
Raffinose	–	d	–	+	–	–	–
Mélibiose	d	+	–	+	–	–	–
Test ONPG	+	+	+	+	+	+	+

d : variable.

Sur CIN, les colonies sont petites (0,5 mm) en 24 heures, pour atteindre 2 à 3 mm en 48 heures, avec un centre rouge foncé caractéristique (Fig. 30.5b).

Certaines souches de *Y. pseudotuberculosis* ne poussent pas sur CIN.

L'isolement à partir des autres prélèvements tient au hasard, les *Yersinia* n'étant pas exigeantes.

Y. enterocolitica et *pseudotuberculosis* possèdent une uréase très active qui peut être recherchée par un test rapide. Ensuite, une identification biochimique complète sera réalisée.

En dehors des caractères généraux des entérobactéries, on peut être orienté par une mobilité à 25 °C (par ciliature péritriche) et une immobilité à 37 °C, des caractères TDA/PDA négatifs (ce qui permet une différenciation avec les *Proteus*), un test ONPG positif sans que les souches possèdent une β-galactosidase, des caractères LDC –, ADH –. La galerie « entérobactérie » permet de confirmer l'espèce (*Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*). On différencie ces deux espèces notamment sur les caractères ODC, VP et saccharose, négatifs pour *Y. pseudotuberculosis*, positifs pour *Y. enterocolitica*.

À noter que certains caractères, tels que le citrate de Simmons et le VP, sont plus nets et plus rapides à 25 °C qu'à 37 °C.

Par ailleurs, au sein de l'espèce *Y. pseudotuberculosis*, on a identifié trois populations : l'espèce *Y. pseudotuberculosis/Y. pestis*, l'espèce non pathogène *Y. similis* et le « Groupe Coréen » potentiellement pathogène pour l'homme.

Récemment, une bandelette a été développée par le Centre national de référence (CNR) et le CEA de Saclay permettant la détection des *Yersinia* entéropathogènes sur selles donnant une réponse en 45 minutes.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet l'identification rapide du genre *Yersinia* à partir d'une colonie, mais la détermination de l'espèce n'est pas toujours correcte et celle des biotypes pas possible.

Le diagnostic différentiel d'espèce avec des espèces plus rares se fait sur la galerie (Tableau 30.16a).

Tableau 30.16b Différenciation des biotypes de *Y. pestis*.

Biotype	Glycérol	Nitrate	Répartition
Antiqua	+	+	Afrique et Asie centrale
Medievalis	+	–	Kurdistan, Caspienne
Orientalis	–	+	Mondiale

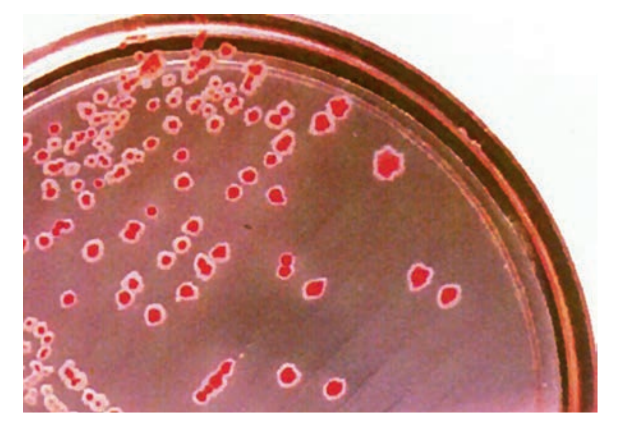


Fig. 30.5b Aspect des colonies d'*Y. enterocolitica* sur gélose CIN.

Tableau 30.16c Différents chimiotypes (biovars) de *Yersinia enterocolitica*.

Caractère/biovar	1*	2	3	4	5
Production indole	+	+	–	–	–
Désoxyribonucléase	–	–	–	+	+
Lipase (Tween® 80)	+	–	–	–	–
Réduction nitrates en nitrites	+	+	+	+	–
Acidification					
D-xylose	+	+	+	–	d
Saccharose	+	+	+	+	d
D-Tréhalose	+	+	+	+	–

* Il existe deux biotypes A et B esculine, salicine, pyramidase tous + pour 1A et – pour 1B.

On peut, en outre, au sein de l'espèce *Y. enterocolitica*, distinguer 5 biovars entre eux (Tableau 30.16c).

Par la caractérisation des sérovars au sein des antigènes O, on dénombre pour *Y. pseudotuberculosis* 8 sérogroupes (I à VIII) et pour *Y. enterocolitica* sensu stricto plus de 29 antigènes O. Ce typage est réalisé par le CNR. Les sérovars O:3 et O:9 sont les plus fréquents chez *Y. enterocolitica*, et pour *Y. pseudotuberculosis*, le type I prédomine.

Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques de *Y. pestis*, à la streptomycine, la tétracycline, au chloramphénicol, molécules couramment utilisées dans les traitements curatifs, est classique. Toutefois, l'isolement récemment à Madagascar de souches multirésistantes, y compris vis-à-vis de ces antibiotiques, doit faire pratiquer cette recherche de résistance liée à un plasmide autotransférable.

Sur antibiogramme standard, on observe habituellement pour *Y. pseudotuberculosis* une sensibilité aux β-lactamines et aux aminosides. En revanche, *Y. enterocolitica* est naturellement résistant à l'ampicilline et amoxicilline + acide clavulanique, à la ticarcilline et aux céphalosporines de première génération par production d'une pénicillinase et d'une céphalosporinase. Les souches sont sensibles aux céphalosporines de troisième génération, aux aminosides et aux fluoroquinolones.

Diagnostic indirect ou sérodiagnostic

Dans la peste, on observe une positivité des anticorps 6 à 10 jours après le début de la maladie, avec un pic vers le 15e jour de la maladie. On recherche les anticorps dirigés contre la capsule (fraction F1) de *Y. pestis* ; la technique la plus utilisée est l'hémagglutination passive (PHA) de globules rouges de mouton, mais la spécificité est médiocre. Aussi, rien ne remplace le diagnostic direct, même si les performances d'un test ELISA sont prometteuses.

Pour les autres yersinioses, on utilise généralement des techniques d'agglutination en ayant recours à des antigènes de I à V pour *Y. pseudotuberculosis* et O:3, O:5 et O:9 pour *Y. enterocolitica*.

Des communautés antigéniques entre *Y. enterocolitica* O:9 et les *Brucella* sont observées ainsi qu'entre *Y. pseudotuberculosis* (II et IV) et *Salmonella*.

Des tests de sérodiagnostic par ELISA ou en Western-blot qui détectent les anticorps dirigés contre les protéines

Yops codées par le plasmide de virulence pYV (commun à *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*) ont été développés et sont disponibles commercialement.

Conclusion

Si le diagnostic bactériologique de peste ne se pose que dans les zones d'endémie, la recherche des *Y. pseudotuberculosis* et *enterocolitica* fait partie de la routine d'un laboratoire de biologie, notamment à partir des selles.

Très récemment, les événements génétiques qui ont transformé une bactérie peu virulente, *Y. pseudotuberculosis*, en tueuse, *Y. pestis*, ont été élucidés (Hinnebusch *et al.*)

À noter que la peste est une maladie à déclaration obligatoire (numéro 9).

Pour en savoir plus

Avril JL, Dabernat H, Denis F, et al. Bactériologie clinique. Paris : Ellipses; 2000.
Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2010; 48 : 1549–54.
Bonnet R. Béta-lactamines et entérobactéries. In : Courvalin P, Leclercq R, Bingen E, editors. Antibiogramme. Paris : ESKA; 2010. p. 141–62.
Bottone EJ. Yersinia enterocolitica : the charisma continues. Clin Infect Dis 1997; 10 : 257–76.
Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology. In : Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity M, editors. (The Proteobacteria), part B (The Gammaproteobacteria), vol. 2. New York : Springer-Verlag; 2005.
Butler T. Yersinia infections : centennial of the discovery of the plague Bacillus. Clin Infect Dis 1994; 19 : 655–63.
Carniel E, Le Guern A.S, Savin C, Simonet M. Yersinia spp (peste exclue). In: Rémic. 2015. p. 591–5.
Croze M, Monnet D, Freney J. Autres entérobactéries. In: Freney F., Renaud F., Leclercq R., Riegel P., editors. Précis de bactériologie clinique 2. Paris: ESKA; 2007. p. 1087–119.
Euzéby JP. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. www.bacdico.net.
Farmer J.J, Davis B.R, Hickman-Brenner F.W, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 1985; 21 : 46–76.
Farmer JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FW, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 1985; 21 : 46–76.
Farmer JJ. Enterobacteriaceae : introduction and identification. In : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Yolken RH, editors. Manual of clinical microbiology. Washington DC : American Society for Microbiology; 2003. p. 636–53.
Frankel G, Giron JA, Valmassoi J, et al. Multi-gene amplification : simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. Mol Microbiol 1989; 3 : 1729–34.
Freney J, Renaud F, Leclercq R, et al. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA; 2007.
Galimand J, Guiyoule A, Gerbaud G, et al. Multidrug resistance of Yersinia pestis mediated by a tranferable plasmid. N Engl J Med 1997; 337 : 677–80.
Hinnebusch M, Chouikha I. Sun YC. Ecological opportunity, evolution and the emergence of flea-borne plague. Infect Immun : 2016; 42 : 84–in press.
Hovette P, Camara P. Peste. In: Maladies infectieuses. Encycl Med Chir, Paris: Elsevier; 2001. p. 8 8-039-V-20.
Janda M. New members of the family Enterobacteriaceae. In : Dworkin M, editor. The Prokaryotes : an evolving electronic resource for the microbiological community. New York : Springer-Verlag; 2002.
Le Minor L, Véron M. Bactériologie médicale. Paris : Flammarion Médecine-Sciences; 1989.
McEvedy C. La peste bubonique. Pour la Science 1988; 4:72–8.
Michel S, Gaillard JL, Berche P. Bactériologie. Bactéries des infections humaines. Paris : Flammarion Médecine-Sciences; 1999.
O'Hara CM, Weinstein P, Miller JM. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. In : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al., editors. Manual of clinical microbiology. Washington DC : American Society for Microbiology; 2003. p. 185–207.
Schmidt H, Knop C, Franke S, et al. Development of PCR for screening of enteroaggregative Escherichia coli. J Clin Microbiol 1995; 33 : 701–5.
Simonet M. Yersinia pestis. In: Freney J., Renaud F., Leclercq R., Riegel P., editors. Précis de bactériologie clinique 2. Paris: ESKA; 2007. p. 1081–6.

Adresses utiles

Centre national de référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*
Unité des bactéries pathogènes entériques
Institut Pasteur
25–28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15
Tél. : 01 45 68 83 39 – Fax : 01 45 68 88 37
E-mail : salmonella@pasteur.fr ou colishig@pasteur.fr
www.pasteur.fr/cnr/salmonella

Laboratoire associé
Service de microbiologie, hôpital Robert-Debré
48, boulevard Serrurier, 75019 Paris
Tél. : 01 40 03 23 40 – Fax : 01 40 03 24 50

Centre national de référence Peste et autres yersinioses
Institut Pasteur, Laboratoire des Yersinia
28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15
Tél. : 01 45 68 83 26 – Fax : 01 40 61 30 01
E-mail : cnr.yersinia@pasteur.fr

30.3 *Vibrionaceae – Aeromonadaceae – Plesiomonas*

O. Barraud, F. Denis, M.-C. Ploy

Généralités

Ces trois genres possèdent des caractéristiques communes qui expliquaient leur regroupement dans la famille des *Vibrionaceae* :

- morphologiques : mobilité par ciliature polaire;
- biochimiques : aéro-anaérobies facultatifs fermentant les glucides;
- catalase négative, oxydase positive.

Actuellement, seuls les *Vibrio*, dont l'espèce type est *Vibrio cholerae*, restent dans cette famille. Les *Aeromonas* sont inclus dans celle des *Aeromonodaceae*, les *Plesiomonas,* avec leur unique espèce *P. shigelloides*, sont désormais rattachés aux *Enterobacteriaceae*.

Les caractéristiques principales des trois genres sont regroupées dans le tableau 30.17.

Tableau 30.17 **Caractères différentiels *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*.**

	Vibrio	*Aeromonas*	*Plesiomonas*
Ciliature	Pm	Pl	Pl
Oxydase	+*	+	+
Halophilie	V	–	–
Sensibilité O129	+*	–	V
Gélatinase	+	+	–
Gaz en glucose	–	V	–
Arginine dihydrolase	–*	+*	+
Ornithine décarboxylase	V	–*	+

Pl : polaire lophotriche ; Pm : polaire monotriche ; V : variable.
* Quelques exceptions.

Genre *Vibrio*

Généralités

Ce sont des bacilles à Gram négatif généralement isolés, droits ou incurvés, assez courts (1,5 à 3,0 µm), parfois franchement cocobacillaires.

Ils sont mobiles par ciliature polaire, le plus souvent monotriche, en milieu liquide. Des formes immobiles ont récemment été observées.

Les *Vibrio* n'ont pas d'exigence nutritive particulière si ce n'est l'halophilie de certaines espèces. Les températures de culture vont de 18 à 38 °C et le pH permettant la culture va de 6 à 9.

Le métabolisme est oxydo-fermentatif, le glucose étant fermenté sans gaz.

La majorité des souches est oxydase positive (sauf *V. metschnikovii*) et sensible au composé vibriostatique O/129 (2-4-diamino-6,7-diisopropylptéridine). Si *V. cholerae* O1 est généralement sensible, le sérogroupe O139 est résistant à l'O/129. Cette résistance est toujours associée à une résistance au triméthoprime. Certaines souches de *V. cholerae* O1 et non O1 résistantes à l'O/129 et au triméthoprime ont aussi été décrites. Cette résistance croisée est portée par un plasmide ou un transposon et peut être transférable d'une souche à l'autre.

Habitat et pouvoir pathogène

On distingue des espèces halophiles (*V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. vulnificus*, etc.) et d'autres halotolérantes (*V. cholerae, V. mimicus*).

L'espèce *V. cholerae*, strictement humaine, est éliminée en quantité dans les selles des malades atteints de choléra (jusqu'à 10^6 à 10^8 vibrions/ml de selles) et ne persiste dans l'environnement que de manière éphémère car c'est une bactérie assez fragile.

Les souches toxinogènes de *V. cholerae* sont responsables du choléra humain qui peut revêtir différents aspects plus ou moins graves, dominés par un début brutal avec une diarrhée massive et une émission de selles afécales « eau de riz », pouvant atteindre 10 à 50 selles par jour (3 à 15 litres éliminés par 24 heures), accompagnées fréquemment de vomissements sans fièvre. Il existe des formes moins graves et d'autres atypiques.

L'incubation après contamination directe (mains sales) ou indirecte (aliments) dure de quelques heures à 5 jours.

Le choléra entraîne une mortalité de 1 à 5 % ; en l'absence de traitement, celle-ci peut dépasser 50 %.

Les souches de *V. cholerae* non toxinogènes peuvent être retrouvées dans des diarrhées, souvent plus bénignes, mais parfois avec des localisations extradigestives.

L'agent du choléra, absorbé par voie orale en quantité suffisante pour franchir la barrière gastrique et le pylore, va venir adhérer aux cellules de la bordure en brosse de la partie proximale de l'intestin grêle grâce à des *pili* permettant d'adhérer aux entérocytes. Il libère la toxine cholérique (CT), holoprotéine thermolabile avec deux composants A et B. Cette toxine entraîne une accumulation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) avec pour effet la sécrétion d'ions chlorure, de bicarbonates et d'eau, et l'inhibition de réabsorption du sodium, d'où la diarrhée aqueuse avec perte d'électrolytes. D'autres toxines peuvent être produites.

La production de toxines par *V. cholerae* est liée à l'intégration dans le génome bactérien d'un bactériophage CTX.

Près de 200 sérogroupes ont été identifiés, O1 et O139 étant les seuls sérogroupes connus comme responsables de choléra avec deux biotypes *cholerae* et *El Tor* et trois sérotypes Inaba, Ogawa et Hikojima. À la fin de 1992, sont apparus des choléras dus à des souches *V. cholerae* O139 dites « Bengale » car les premières épidémies se sont déclarées au Bengladesh. L'épidémie qui sévit en Haïti depuis fin 2010 est due à une souche de *V. cholerae* de sérogroupe O1, biotype *El Tor*, sérotype Ogawa.

Les souches de *V. cholerae* non O1-non O139 (non agglutinées par les sérums 01 et 0139) peuvent provoquer des atteintes digestives de type entéro-invasif ou être à l'origine de manifestations extradigestives variées plus ou moins sévères (des cas de septicémies et méningites ont été rapportés).

Les autres espèces de *Vibrio* ainsi que les souches non O1 sont largement répandues dans la nature (eaux salées, faune marine, algues, vase, etc.).

Parmi les autres espèces de vibrions qui peuvent être retrouvées chez l'homme, on trouve :

- *V. parahaemolyticus*, agent de diarrhées aiguës chez l'homme après ingestion de fruits de mer contaminés, les symptômes survenant souvent 2 à 6 heures après le repas ;
- *V. alginolyticus*, qui est isolé à partir de prélèvements cutanés après contact avec de l'eau de mer ; c'est le cas aussi de *V. vulnificus* qui peut, en outre, se présenter sous forme septicémique après ingestion de fruits de mer ;
- d'autres espèces de *Vibrio* ont parfois été associées à des pathologies chez l'homme (*V. hollisae*, *V. damsela*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis*).

Prélèvements

Les selles constituent le prélèvement majeur en cas de suspicion de choléra ou d'atteinte digestive due à un *Vibrio*. Elles sont recueillies dans un récipient stérile étanche, le plus tôt possible au cours de la maladie, avant tout traitement antibiotique et transportées en sachet scellé, clairement identifié.

Dans certains cas – suspicion de « choléra sec » –, on peut être amené à pratiquer un écouvillonnage rectal.

Si l'examen est différé pour des raisons d'intendance, il est conseillé de pratiquer sur place un ensemencement en eau peptonée salée (2 % NaCl) et alcaline (pH 9) et d'adresser le tube à vis au laboratoire en même temps que la selle dans un emballage aux normes en vigueur. Il est également possible d'utiliser comme milieu de transport le milieu de Cary-Blair.

Il est aussi possible d'imprégner du papier filtre avec les selles ; ce système permet de conserver viables les souches de *Vibrio* pendant 5 semaines.

Dans le cas de manifestations autres que la symptomatologie digestive, divers prélèvements peuvent être effectués (hémocultures, prélèvements cutanés, pus profonds, liquides de ponction, etc.). Les échantillons d'eaux, d'aliments doivent être recueillis dans des flacons stériles contenant du chlorure de sodium et gardés à +4 °C avant analyse réalisée dans les 8 à 12 heures. L'eau devra être filtrée à travers une membrane de 0,45 µm et déposée sur milieu sélectifs TCBS (thiosulfate de sodium-citrate de sodium-bile de bœuf-saccharose).

Examen de l'échantillon

Les selles cholériques sont afécales avec un aspect riziforme.

Au microscope à l'état frais, on observe du mucus, pas de leucocytes, mais une flore monomorphe de bacilles incurvés mobiles qui apparaissent Gram négatif après coloration. Il existe une technique d'immunofluorescence utilisant des anticorps monoclonaux anti-O1 permettant une identification de *V. cholerae* O1, mais cela est réservé à quelques laboratoires spécialisés. La morphologie, notamment à partir des cultures, peut être atypique et prendre l'aspect de sphéroplastes.

Mise en culture

Il est conseillé d'ensemencer en parallèle (Fig. 30.6) des milieux d'enrichissement et d'isolement. L'enrichissement en milieu liquide peut être réalisé via :

- de l'eau peptonée alcaline à 1 % et 3 % de NaCl ; ou
- un milieu taurocholate-tellurite-peptone (TTG).

Ce milieu d'enrichissement sera repiqué sur milieu solide d'isolement après 6 à 8 heures d'incubation à 37 °C.

La culture en milieu liquide est caractéristique et forme un voile à la surface du milieu.

Concernant l'isolement en milieu solide, on distingue des milieux :

- peu sélectifs : gélose nutritive avec 0,1 % de Teepol, gélose trypticase soja alcaline (pH 9), gélose Mueller-Hinton, qui peut également servir pour tester l'activité amylasique, la sensibilité au 0/129 et à la polymyxine ;

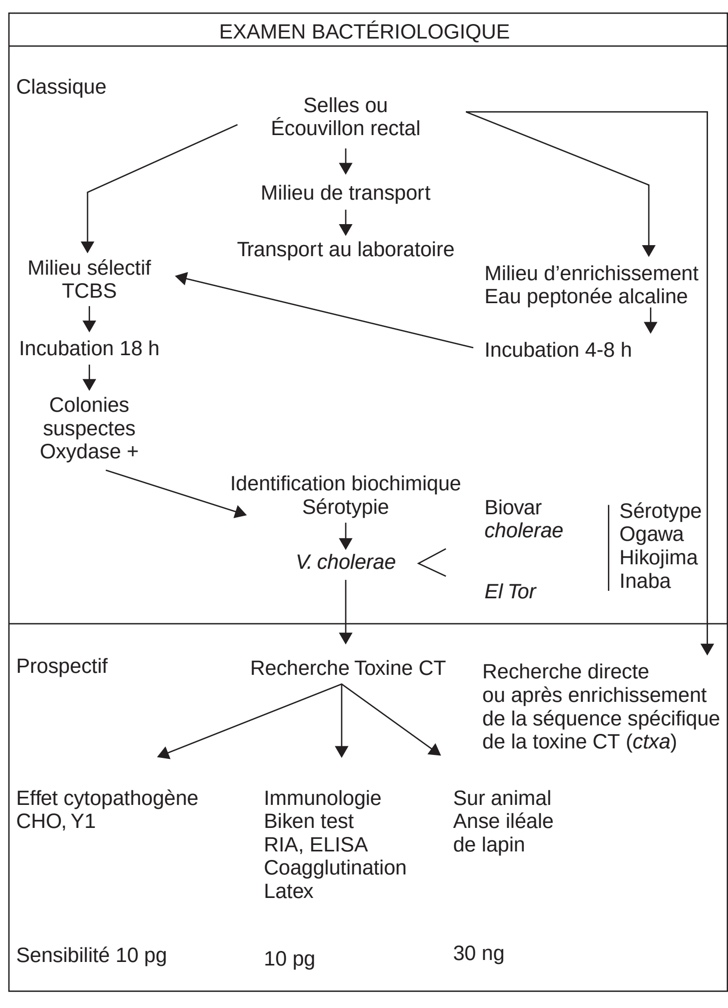


Fig. 30.6 Étapes du diagnostic bactériologique de *Vibrio cholerae* : diagnostic classique et prospectif.

- sélectifs : gélose TCBS sur laquelle les colonies saccharose positives apparaissent en jaune (c'est le cas de *V. cholerae*) et négatives en vert (Fig. 30.7).

Ce milieu est conseillé ; il est assez sélectif, inhibant *Pseudomonas* et *Aeromonas*, mais pas toujours les *Proteus* ou des bactéries à Gram positif.

À noter que, sur ce milieu, la réaction d'oxydase est aléatoire et que certaines souches de *V. cholerae* n'ont pas la coloration attendue (notamment saccharose négative).

Caractères principaux

Les caractères principaux des vibrions les plus fréquemment isolés sont colligés dans le tableau 30.18.

Vibrio cholerae

Diagnostic direct

Identification présomptive

Cinq colonies suspectes différentes seront étudiées. Sur milieu TCBS, elles apparaissent comme de grandes colonies jaunes convexes. Leur coloration tend au vert si l'incubation est prolongée au-delà de 24 heures.



Fig. 30.7 Aspect des colonies de *Vibrio cholerae* sur milieu TCBS.

L'orientation du diagnostic se fera sur l'aspect au Gram où les bactéries apparaissent fréquemment coccobacillaires et sur la mobilité (Fig. 30.8). On pourra tester le composé vibriostatique 0/129 et la polymyxine sur milieu de Mueller-Hinton ; les souches O1 sont généralement sensibles au composé vibriostatique et les O139 résistantes.

La réaction d'oxydase pourra être tentée. Une agglutination directe sur lame avec chacun des deux sérums anti-O1 et anti-O139 sera alors pratiquée. Si ce test est négatif, il faudra reprendre l'agglutination après chauffage de la suspension bactérienne 2 heures à 100 °C.

En période épidémique, ces quelques tests peuvent être suffisants.



Fig. 30.8 Aspect typique incurvé de *Vibrio cholerae*.

Tableau 30.18 Caractères différentiels des principales espèces de vibrions halophiles ou non halophiles.

	Oxydase	Nitrate réductase	Croissance			ADH	LDC	ONPG	VP	Indole
			TCBS	Sans NaCl	1 % NaCl					
V. cholerae	+	+	J*	+	+	–	+	+	V	+
V. mimicus	+	+	V	+	+	–	+	+	–	+
V. fluvialis	+	+	J	–	+	+	–	V	–	–
V. vulnificus	+	+	V	–	+	–	+	+	–	+
V. parahaemolyticus	+	+	V	–	+	–	+	–	–	+
V. alginolyticus	+	+	J	–	+	–	+	–	+	+
V. anguillarum	+	+	J	+	+	+	–	+	+*	+
V. metschnikovii	–	–	J ou V	–	+	V	V	V	+	V

TCBS (milieu thiosulfate-citrate-bile-saccharose).
J : jaune = saccharose +, V : vert = saccharose –.
* Quelques exceptions.

Diagnostic de certitude

L'orientation est donnée par les réactions précédentes. L'identification complète sera entreprise avec l'ensemble des réactions indiquées dans les tableaux 30.17 et 30.18.

- **Identification biochimique :** l'utilisation de galeries biochimiques prêtes à l'emploi permet d'obtenir des résultats satisfaisants à condition de réaliser la suspension bactérienne en solution à 1 % de NaCl. Cela permet de confirmer le diagnostic de *Vibrionaceae*, puis d'espèce *V. cholerae* (Tableau 30.18). La différenciation entre les biovars *cholerae* classique et *El Tor* repose sur les caractères indiqués dans le tableau 30.19.
- **Identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) :** elle peut être réalisée, mais elle se limitera à l'identification de l'espèce, sans permettre la détermination du biovar et des sérogroupes.
- Identification sérologique :
  - *souches de sérogroupe O1*. Ce sérogroupe O1 comporte trois spécificités antigéniques (A, B, C) aussi bien pour le biovar classique que pour le biovar *El Tor*, la combinaison de ces antigènes aboutissant à l'individualisation des trois sérotypes Ogawa, Inaba et Hikojima (Fig. 30.9). Les sérotypes Ogawa et Inaba sont les plus fréquents. Toute souche de *Vibrio cholerae* O1 doit être envoyée au Centre national de référence (CNR) et la déclaration est obligatoire ;
  - *souches O1 atypiques :* on rencontre des souches de *Vibrio cholerae* O1 résistantes au composé vibriostatique et ne fermentant pas le saccharose. Ces souches posent un gros problème d'identification différentiel avec *V. mimicus* en identification biochimique. L'agglutination par l'anti-O1 permet cependant de les différencier. Par ailleurs, un petit nombre de souches de *V. cholerae* qui agglutinent avec des antisérums O1 ont été isolées dans le monde entier tant dans les zones endémiques du choléra que dans des zones indemnes de choléra. Elles ne produisent pas de toxine CT ;

Tableau 30.19 Diagnostic différentiel entre les biovars *cholerae* et *El Tor*.

	V. cholerae classique	*V. cholerae El Tor*
Hémolyse (sang de mouton)	–	+ (– depuis 1970)
Polymyxine (50 U)	Sensible	Résistant
VP	–	+

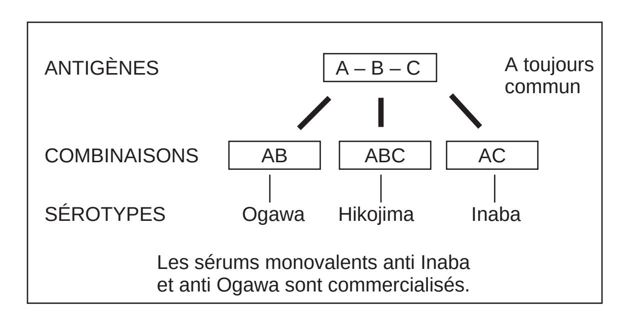


Fig. 30.9 Sérotypes de *Vibrio cholerae*.

  - *souches non O1 :* devant une souche de *V. cholerae* n'agglutinant pas avec l'antisérum O1, on tente devant un syndrome cholériforme une agglutination avec l'antisérum O139 ;
  - *souches non O1, non O139 :* elles doivent faire l'objet d'études complémentaires telle la recherche de toxine CT. On rencontre ce type de souche en zone non endémique avec des tableaux cliniques de gravité variable.

À noter que des tests rapides (quelques minutes) reposant sur des méthodes immunologiques ont été développés récemment ; celles-ci recherchent le LPS de *V. cholerae* par immunochromatographie. Ces tests sont applicables sur selles ou écouvillonnage rectal. Ils permettent la détection des deux sérogroupes O1 et O139 avec des sensibilités et des spécificités supérieures à 90 %.

Mise en évidence de la toxine cholérique (CT)

La toxine cholérique peut classiquement être mise en évidence par des techniques in vivo comme l'anse intestinale ligaturée chez le lapin ou sur culture de cellules (cellules Y1 ou cellules rénales de hamster chinois). À partir d'une souche, il est aussi possible de rechercher la toxine par méthode immunologique. Mais le plus sensible est d'utiliser des techniques de biologie moléculaire permettant la recherche indirecte de la toxine sur la souche mais aussi dans les selles par amplification génique (PCR) via la détection du gène de la sous-unité A de la toxine (*ctx*A).

Sensibilité aux antibiotiques

Outre l'étude de la sensibilité à la polymyxine, utile au diagnostic de biovar, un antibiogramme doit être pratiqué en raison de l'apparition de souches multirésistantes soit en milieu solide sur gélose Mueller-Hinton, soit en milieu liquide sur systèmes automatisés. L'ampicilline est inactive sur la plupart des souches. Des résistances aux tétracyclines, au triméthoprime et au cotrimoxazole ont été fréquemment décrites. Les *Vibrio* demeurent en général sensibles aux aminosides, au chloramphénicol, aux quinolones et aux céphalosporines de 3e génération. Des souches multirésistantes, y compris aux carbapénèmes, ont émergé du fait de l'acquisition de différents éléments génétiques mobiles. L'élément conjugatif intégratif SXT est très répandu au sein des *Vibrio* et entraîne une multirésistance aux antibiotiques.

Diagnostic indirect : sérodiagnostic

La recherche d'agglutinines, d'anticorps vibriocides ou d'anticorps antitoxine CT n'a pas d'intérêt pour un diagnostic en phase aiguë.

Autres vibrions

- *Vibrio parahaemolyticus* : les prélèvements doivent être ensemencés en double comme indiqué pour *V. cholerae* (milieu d'enrichissement, milieu sélectif : TCBS), l'eau peptonée salée étant repiquée au bout de 6 à 8 heures sur milieu solide. L'incubation des milieux se fait à 30 °C avec observation en 48 heures de colonies bleu-vert sur TCBS. Les vibrions apparaissent très mobiles. Les souches tolèrent 7 à 8 % de NaCl alors que *V. alginolyticus*

peut cultiver sur 10 % de NaCl. *V. parahaemolyticus* (voir Tableau 30.18) est VP, ONPG, saccharose et arabinose négatifs. Certaines souches présentent une hémolyse β sur milieu de Wagatsuma (contenant 5 % de sang défibriné de lapin ou humain) ; elles sont dites Kanagawa positif (Fig. 30.10) et sont pathogènes pour l'homme, contrairement aux Kanagawa négatifs non hémolytiques. Une PCR en temps réel détectant le gène *tdh* codant l'hémolysine thermostable de *V. parahaemolyticus* a été développée et est très performante.

- *Vibrio alginolyticus* est plus halophile que *V. cholerae*, avec lequel il partage beaucoup de caractères.
- *Vibrio vulnificus* présente une ONPG rapide, est lactose positif et résiste constamment à la colistine. À noter qu'il existe des colonies de *V. vulnificus* « en léthargie » viables, mais non ou difficilement cultivables.

Genre *Aeromonas*

Il s'agit de bacilles à Gram négatif aéro-anaérobies, oxydase positive, fermentant le glucose avec ou sans gaz, réduisant les nitrates en nitrites, mobiles par ciliature polaire ou immobiles, résistants au composé vibriostatique O/129.

Pouvoir pathogène et habitat

Les *Aeromonas* sont des bactéries des eaux, contaminant fréquemment les eaux douces ou de lagune et certains aliments tels les coquillages et les poissons. Ces bactéries peuvent persister plusieurs mois ou années dans les eaux ou les sols. À l'exception d'*A. salmonicida*, les *Aeromonas* peuvent infecter l'homme après immersion (noyades) ou après ingestion de produits contaminés (y compris eau « potable »). Ces bactéries sont impliquées dans la contamination de plaies souvent après contact avec de l'eau polluée, dans des diarrhées (du fait de la production d'entérotoxines), mais également dans des septicémies ou des infections graves hospitalières sur terrain prédisposé. Des infections pulmonaires après noyade ont aussi été décrites.

À l'heure actuelle, parmi les 16 espèces génomiques identifiées, trois espèces mobiles d'*Aeromonas* sont les plus fréquemment retrouvées dans des infections humaines : *A. hydrophila, A. caviae* et *A. veronii* subsp. *sobria*.

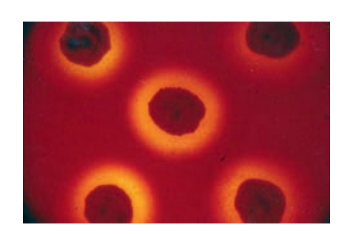


Fig. 30.10 Souches de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positives sur milieu de Wagatsuma.

Caractères bactériologiques

La température optimale de croissance est de 30 °C (sauf *A. salmonicida*). Le pH optimal est de 7. Les souches ne cultivent pas en milieu hypersalé. Les colonies d'*Aeromonas* apparaissent en 24 heures en milieu solide et ressemblent à celles des coliformes. La culture est possible sur milieux trypticase-soja ou gélose au sang, mais aussi sur milieux sélectifs MacConkey, EMB (éosine-bleu de méthylène) ou Drigalski, voire pour les selles sur milieu rendu sélectif par l'addition d'ampicilline pour les coprocultures. La résistance constante au composé vibriostatique O/129 permet de les différencier aisément des *Vibrio*. Le caractère gélatinolytique et l'absence d'ODC permettent de les distinguer de *Plesiomonas shigelloides* (Tableau 30.20). À noter que le milieu CIN utilisé pour l'isolement des *Yersinia* permet aussi la croissance des souches d'*Aeromonas*.

L'identification phénotypique au niveau de l'espèce est assez aisée pour les espèces courantes. Mais les galeries ne sont fiables que si les réactions d'orientation et la différenciation *Vibrio*/*Aeromonas* ont été préalablement réalisées, et en pratiquant correctement les tests biochimiques, notamment d'étude d'activité décarboxylasique, d'hydrolyse de

Tableau 30.20 **Caractères différentiels des *Aeromonas, Plesiomonas*.**

Caractères d'orientation	*Aeromonas*				*Plesiomonas shigelloides*
	hydrophila	*caviae*	*Veronii* subsp.		
			sobria	*veronii*	
Gaz glucose	+	–	+	+	–
VP	+	–	+	+	–
ADH	+	+	+	–	+
LDC	+	–	+	+	+
ODC	–	–	–	+	+
Esculine	+	+	–	+	–
Arabinose	+	+	–	–	–
Saccharose	+	+	+	+	–
m-Inositol	–	–	–	–	+
Sensibilité :					
– Ampicilline	R	R	R	R	S
– Céfalotine	R	R	S	S	S

l'esculine ou de production d'acétoïne. La spectrométrie de masse permet de faciliter l'identification des espèces.

Sensibilité aux antibiotiques

Les *Aeromonas* sont généralement résistants aux aminopénicillines et carboxypénicillines ainsi qu'à la céfalotine. Les céphalosporines de 3e génération sont régulièrement actives, mais des souches résistantes sont décrites.

Les *Aeromonas* sont très sensibles aux fluoroquinolones, sensibles aux aminosides et à l'association triméthoprime–sulfaméthoxazole.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques est indispensable sur toutes les souches susceptibles d'être pathogènes, des souches résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques ayant été décrites. La sensibilité des *Aeromonas* à la colistine est variable.

Genre *Plesiomonas*

Ce genre ne comporte qu'une seule espèce : *Plesiomonas shigelloides*. Malgré une oxydase positive, cette bactérie est désormais rattachée à la famille des *Enterobacteriaceae* (voir chapitre 30.2).

Caractères bactériologiques

C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, mobile, oxydase positive, fermentant le glucose sans production de gaz, réduisant les nitrates en nitrites. Contrairement aux *Vibrio* et *Aeromonas*, cette espèce ne produit pas d'enzymes exocellulaires (DNAse, gélatinase, etc.). La température de croissance optimale est de 37 °C. *Plesiomonas* ne peut pas croître en dessous de 8 °C. *Plesiomonas* cultive bien sur milieux ordinaires.

Plesiomonas est résistant à l'O/129 si on utilise des disques chargés à 10 µg, mais sensible si les disques sont chargés à 150 µg. Certaines souches ont des communautés antigéniques avec les *Shigella* et peuvent donner des agglutinations croisées avec les antisérums utilisés pour agglutiner les *Shigella*.

Pouvoir pathogène et habitat

Plesiomonas shigelloides est une bactérie des eaux qui peut être retrouvée dans l'intestin de divers animaux. Chez l'homme, cette espèce a été retrouvée dans des selles de sujets diarrhéiques surtout en zone tropicale et occasionnellement en Europe. Les hypothèses physiopathologiques concernant le mécanisme de ces diarrhées – entéro-invasivité ou entérotoxicité – n'ont pas reçu de confirmation à ce jour.

Cette espèce est retrouvée principalement :

- dans les gastro-entérites de l'adulte ;
- dans des septicémies chez des sujets immunodéprimés ou ayant des pathologies sous-jacentes (drépanocytose, thalassémie, etc.) ;
- dans des méningites principalement néonatales avec un pronostic sombre (75 % de décès).

Identification

Les caractères ODC, LDC, ADH positifs et la fréquente sensibilité au composé vibriostatique sont les éléments majeurs d'orientation (Tableau 30.20). Les géloses ordinaires peuvent être utilisées pour isoler *P. shigelloides* à partir des selles ; les milieux sélectifs usuels utilisés pour l'isolement des *Salmonella* et *Shigella* permettent aussi de cultiver *P. shigelloides*. Sur gélose Columbia au sang, les souches de *Plesiomonas* ne sont pas hémolytiques, contrairement aux *Vibrio* et *Aeromonas*.

P. shigelloides est fréquemment résistant aux aminosides, aux amino-, carboxy- et uréidopénicillines, mais reste sensible aux céphalosporines, à l'imipénème et aux fluoroquinolones.

Pour en savoir plus

Abbott SL. Aeromonas. In : Murray P, editor. Manual of clinical microbiology. Washington : ASM Press ; 2003. p. 701–5.

Aberkane S, Compain F, Barraud O, et al. A non-O1/non-O139 Vibrio cholerae avian isolate co-carrying the blaVIM-1 and blaVIM-4 genes, France. Antimicrob Agents Chemother 2015 ; 59 : 6594–6.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cholera outbreak - Haiti, October 2010. Morb Mortal Wkly Rep 2010 ; 59 : 1411.

Denis F. Les vibrions. In : Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H, editors. Bactériologie clinique. Paris : Ellipses ; 2000.

Dodin A, Fournier JM. Méthodes de laboratoire pour le diagnostic du vibrion cholérique et des autres vibrions. Paris : Institut Pasteur, CLRE ; 1992.

Farmer JJ, Janda JM, Birkhead K. Vibrio. In : Murray P, editor. Manual of clinical microbiology. Washington : ASM Press ; 2003. p. 706–18.

Freney J, Renaud F, Bollet C, et al. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2003[chap. 9].

Hansen W. Vibrio. In : Freney J, Renaud F, Bollet C, Leclercq R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2003.

Monteil H, Harf-Monteil C. Les infections à Aeromonas. Presse Med 1997a ; 26 : 1790–8.

Monteil H, Harf-Monteil C. Plesiomonas shigelloides : une bactérie exotique. Lettre Infect 1997b ; 6 : 255–62.

Nato F, Boutonnier M. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of V. cholerae 0–1 and 0–139 in stool samples. Clin Diagn Lab Immunol 2003 ; 10 : 476–8.

Richard C, Denis F, Papa F. Vibrio parahaemolyticus. Souches humaines et de l'environnement marin. Bilan de 113 souches. Bull Ass Anc Élèves Inst Pasteur 1981 ; 89 : 16–21.

Richard C, Gammanco G, Popoff M. Vibrio parahaemolyticus. Isolement et diagnostic biologique. Ann Biol Clin (Paris) 1974 ; 32 : 33–46.

Wachsmuth JK, Blake PA, Olsvik O. Vibrio cholerae and cholera. Washington : ASM Press ; 1994.

30.4 Bacilles à Gram négatif non fermentaires

C. Martin, V. Cattoir

Généralités

Sous le vocable de « bacilles à Gram négatif non fermentaires » (BGN-NF) sont regroupés plusieurs familles et genres de bactéries mobiles ou immobiles, cultivant sur milieux ordinaires et possédant un métabolisme respiratoire strict (utilisation de l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons). À noter que certains genres peuvent utiliser les nitrates

comme accepteur terminal d'électrons en anaérobiose (par exemple *Pseudomonas aeruginosa*). Ces BGN à métabolisme oxydatif ne fermentent pas les sucres en anaérobiose et sont qualifiés de « non fermentants » ou « non fermentaires ».

Dans un laboratoire de bactériologie médicale, 10 à 15 % des BGN isolés sont des BGN-NF et environ les trois quarts appartiennent à l'espèce *P. aeruginosa*. Les autres espèces isolées le plus fréquemment appartiennent aux genres *Pseudomonas* (autres que *P. aeruginosa*), *Acinetobacter*, *Stenotrophomas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium* et *Ralstonia*.

Étant donné l'étendue, l'hétérogénéité et la complexité des données taxonomiques, nous présenterons les données concernant les principales espèces bactériennes rencontrées en pratique médicale en fonction de caractères d'orientation simples. En dehors de quelques espèces (*P. aeruginosa*) dont l'identification pose peu de problèmes, l'identification phénotypique des autres BGN-NF est restée longtemps difficile, avec le recours nécessaire à des méthodes moléculaires (séquençage des gènes *rrs* [ADNr 16S], *rpo*B, *gyr*B, *rec*A, etc.). La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a révolutionné l'identification bactérienne, y compris celle des BGN-NF, permettant l'identification au niveau de l'espèce et au niveau du genre (ou complexe) dans respectivement 75 à 90 % et 90 à 100 % de ceux-ci selon les études. Seulement environ 5 % des souches testées ne sont pas correctement identifiées ou sont non identifiables par cette technique.

Taxonomie

Le vaste groupe des BGN-NF a fait l'objet de nombreux remaniements taxonomiques avec l'apport des données génomiques, ayant pour conséquence l'établissement d'une classification plus précise concernant les *Pseudomonas* et apparentés (Tableau 30.21) et la réassignation dans de nouveaux genres ou le transfert dans des genres déjà existants (Tableau 30.22). Par exemple, le genre *Pseudomonas* a hébergé un nombre croissant d'espèces par manque de caractères phénotypiques spécifiques, puis a été restreint à une cinquantaine d'espèces après l'apport des travaux génétiques. De nouveaux genres (*Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Delftia*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas*) ont été créés pour accueillir les espèces exclues. Parmi les autres BGN-NF, la famille des *Flavobacteriaceae* regroupant de nombreuses espèces dont le caractère commun était une pigmentation jaune a également

Tableau 30.22 **Principales espèces de bacilles à Gram négatif non fermentants autres que *Pseudomonas* et apparentés isolées en clinique.**

Genre	Espèces
Achromobacter	*A. xylosoxidans*, *A. denitrificans*, *A. dolens*, *A. piechaudii*, *A. rublandii*
Alcaligenes	*A. faecalis*
Asia	*A. bogorensis*, *A. lannensis*
Balneatrix	*B. alpica*
Bergeyella	*B. zoohelcum*
Chryseobacterium	*C. anthropi*, *C. hominis*, *C. indologenes*
Elizabethkingia	*E. meningoseptica*, *E. miricola*
Empedobacter	*E. brevis*
Inquilinus	*I. limosus*
Methylobacterium	*M. mesophilicum*
Myroides	*M. odoratimimus*, *M. odoratus*
Ochrobactrum	*O. anthropi*, *O. intermedium*
Rhizobium	*R. radiobacter*
Roseomonas	*R. gilardii*, *R. cervicalis*, *R. fauriae*, *R. mucosa*
Shewanella	*S. algae*, *S. putrefaciens*
Sphingobacterium	*S. mizutaii* (indole +) *S. multivorum*, *S. spiritivorum*, *S. thalpophilum* (indole –)
Sphingomonas	*S. paucimobilis*, *S. parapaucimobilis*
Wautersiella	*W. falsenii*
Weeksella	*W. virosa*

Tableau 30.21 **Classification actuelle des principales espèces de *Pseudomonas* et bactéries apparentées rencontrées en pathologie humaine.**

Groupe d'homologie (ARNr)	Genres	Espèces
I	*Pseudomonas*	Espèces fluorescentes : *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. veronii*, *P. monteilii*, *P. mosselii* Espèces non fluorescentes : *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. luteola*, *P. oryzihabitans*
II	*Burkholderia* *Ralstonia* *Cupriavidus* *Pandoraea*	*B. cepacia* complex (*B. multivorans*, *B. cenopacia*, *B. vietnamiensis*, *B. cepacia*, *B. dolosa*) *B. gladioli* *B. mallei*, *B. pseudomallei* *R. pickettii*, *R. mannitolilytica*, *R. insidiosa* *C. pauculus*, *C. gilardii*, *C. respiraculi*, *C. taiwanensis* *P. apista*, *P. pulmonicola*, *P. pnomenusa*, *P. sputorum*
III	*Comamonas* *Acidovorax* *Delftia*	*C. testosteroni* *A. delafieldii*, *A. temperans*, *A. wautersii* *D. acidovorans*
IV	*Brevundimonas*	*B. diminuta*, *B. vesicularis*
V	*Stenotrophomonas*	*S. maltophilia*

subi de nombreux remaniements et comprend actuellement les genres *Bergeyella*, *Capnocytophaga* (non traité dans ce chapitre), *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia*, *Empedobacter*, *Myroides*, *Wautersiella*, *Weeksella* et le genre *Flavobacterium* restreint à une dizaine d'espèces.

Habitat et pouvoir pathogène

Les BGN-NF sont ubiquitaires, isolés de l'environnement (eaux douces et de mer, effluents, sol, végétaux, poussières en suspension dans l'air), mais également retrouvés au niveau du tractus digestif des animaux. Ces bactéries ayant peu d'exigences nutritives survivent et se multiplient dans les milieux humides, notamment dans l'environnement hospitalier (robinet, évier, siphon, vase), et peuvent aussi contaminer des solutions antiseptiques. Ces bactéries sont à l'origine d'infections nosocomiales d'origine exogène (infections manuportées, infections sur matériel implanté) et d'origine endogène (microbiote cutané ou intestinal) chez des patients le plus souvent immunodéprimés.

Démarche diagnostique

L'identification des BGN-NF peut reposer sur l'utilisation de galeries spécifiques après orientation à partir de caractères morphologiques microscopiques et macroscopiques et d'épreuves biochimiques simples (voir Tableau 30.23). À noter que la spectrométrie de masse MALDI-TOF permet une identification plus fiable et plus rapide des BGN-NF, mais que cet outil n'est pas encore disponible dans tous les laboratoires.

Caractères morphologiques

Aspects microscopiques

Les aspects microscopiques après examen à l'état frais entre lame et lamelle et après coloration de Gram permettent d'orienter le diagnostic vers un groupe bactérien. Parmi les espèces du genre *Acinetobacter*, on retrouve des bactéries immobiles souvent regroupées en diplobacilles à extrémités arrondies de forme courte (coccobacilles) ou longue qui se décolorent parfois difficilement. Les espèces du genre *Pseudomonas* apparaissent comme des bacilles longs à extrémités effilées.

Caractères culturaux

Toutes les bactéries non fermentaires sont aérobies strictes. Leur croissance est parfois plus lente que celle des entérobactéries, surtout à 37 °C, en raison d'une température optimale de croissance généralement à 30 °C. La culture de certaines espèces des genres *Pseudomonas* et *Burkholderia* à 41 °C est un caractère diagnostique utile.

L'observation d'une pigmentation des colonies ou la diffusion de pigment dans le milieu de culture peut orienter vers certains genres (*Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Sphingobacterium*, etc.) ou permettre une identification certaine (*P. aeruginosa*).

Caractères biochimiques

Bien que l'utilisation courante de galeries ou de cartes qui permettent l'identification après lecture par un automate dispense de réaliser certaines épreuves d'orientation, celles-ci peuvent être utiles en présence de souches atypiques ou de résultats « aberrants ».

Réaction des oxydases

La réaction des oxydases est négative pour certaines espèces (par exemple *Acinetobacter* spp., *S. maltophilia*, *P. luteola*, *P. oryzihabitans*), mais le résultat peut être faussement négatif en fonction des réactifs utilisés (N,N-diméthyl- ou N,N,N,N-tétra-méthyl-paraphénylène-diamine-monohydrochloride) et d'une durée d'observation trop courte si la réaction est lente (1 minute).

Détermination du caractère non fermentaire et de l'acidification des sucres

Le caractère non fermentaire d'une souche peut être visualisé sur un milieu Hajna ou TSI sur lequel sera détectée une culture uniquement sur la pente sans production de gaz. Si des doutes subsistent, l'étude de l'acidification des sucres pourra être pratiquée en milieu de Hugh et Leifson.

Utilisation des nitrates

Certaines espèces (par exemple *P. aeruginosa*) peuvent, en anaérobiose, utiliser les nitrates comme accepteur final d'électron et ainsi « respirer les nitrates ». Cette recherche sera alors réalisée sur milieu mannitol-mobilité après régénération 20 minutes à 100 °C.

Recherche d'activités enzymatiques et assimilation de substrats carbonés

La recherche d'activité du métabolisme protéique (ADH, LDC, ODC, uréase), la production de métabolites (indole) ainsi que l'assimilation de divers substrats carbonés (auxanogramme) sont réalisées à l'aide de systèmes d'identification plus au moins automatisés.

Galeries et systèmes d'identification

Les systèmes d'identification utilisent des cartes ou des galeries « universelles Gram négatif » (Phoenix NID®, Crystal E/NF [Becton Dickinson] ; API 32GN®, Vitek 2 GN® [bioMérieux]) ou adaptées à ce groupe (RapID NF Plus Panel® [Remel, Oxoid]) ; API 20NE® [bioMérieux]). Les résultats obtenus à partir de ces systèmes (lecture visuelle puis codage ou lecture à l'aide d'un automate) sont confrontés à des catalogues analytiques constitués des résultats obtenus à partir de collections d'isolats cliniques. Les résultats concernant des souches atypiques peuvent nécessiter la réalisation de réactions complémentaires proposées dans la fiche de résultats.

Conduite pratique de l'identification

L'orientation du diagnostic est établie d'après les caractères indiqués dans le tableau 30.23. Les résultats de l'antibiogramme peuvent conforter les résultats de l'identification, comme la résistance de *B. cepacia* à la colistine.

Genre *Pseudomonas*

Généralités

La classification en genres et espèces à l'intérieur de la famille des *Pseudomonadeceae* a longtemps reposé sur des

Tableau 30.23 **Principaux caractères d'orientation des bacilles à Gram négatif non fermentaires.**

Genre / Espèces	Morphologie[a]	Croissance sur gélose T5	Mobilité	Oxydase*	Pigmentation	Colistine[b]	Indole	Saccharose	H_2S (TSI)	Remarques
Pseudomonas	b	+	+	+	V	S	–	V		* Sauf *P. luteola* et *P. oryzibitans*
Burkholderia	b	+	+	+	–	R		V		* Sauf *B. mallei*
Pandoraea	b	+	+	V	–					
Ralstonia	b	+	+	+	–			–		
Brevindimonas	b	+	+	+	+		–	–		
Comamonas	b	+	+	+	V		–	–		
Stenophomonas maltophilia	b	+	+	–	+	V	–	V		
Acinetobacter	c/cb	+	–	–	–		–			
Bordetella	b/cb	V	V	V	V			–		
CDC groupe EO5	b	+	–	–	V			–		
CDC groupe NO-1	cb	+	–	–	–			–		
Moraxella, Oligella	c/cb	V	–	+	–		–			* Sauf *O. ureolytica*
Chryseobacterium	b	+	–	+	+	R	+	V	–	
Weeksella	b	+	–	+	+		+	–	–	
Bergeyella	b	+	–	+	–		+	–	–	
Empedobacter brevis	b	+	–	+	+		+	–	–	
Balneatrix	b	+	+	+	+		+	–	–	
Schewanella	b	+	+	+	+	S	ND		+	
Alcaligenes	b	+	+	+	+		–	–	–	
Achromobacter	b	+	+	+			–	–	–	
Agrobacterium	b	+	+	+	V		–	–	–	
Ochrobacterium antropi	b	+	+	+	–	V	–	–	–	
Sphingomonas paucimobilis	b	+	+	+	+	V	–	–	–	
Sphingobactrium	c/cb	+	–	+	+		–	+	–	
Myroides	b	+	–	+	+		–	–	–	
CDC groupes EO-2 et 3	c/cb	+	–	+	V		–	+	–	

[a] b : bacille ; c : cocci ; cb : coccobacille.
[b] R : résistant ; S : sensible.
ND : non déterminé ; V : variable.

caractères phénotypiques simples d'orientation. La simplification de cette classification a été réalisée par Stanier qui a étudié principalement l'assimilation des substrats carbonés (auxanogramme) et par Palleroni qui a classé les espèces de *Pseudomonas* en cinq groupes génomiques, les *Pseudomonas* « *vrais* » appartenant au groupe I (Tableau 30.21).

Les *Pseudomonas* stricto sensu sont des BGN, aérobies stricts, non fermentaires, oxydase positive (sauf *P. luteola* et *P. oryzihabitans*), mobiles par une ciliature polaire monotriche ou multitriche, oxydant ou non le glucose et n'accumulant pas du poly-β-hydroxybutyrate. Certaines espèces peuvent respirer les nitrates (par exemple *P. aeruginosa*) en anaérobiose tandis que d'autres peuvent fermenter l'arginine.

Le genre *Pseudomonas* comprend des espèces fluorescentes (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. veronii*, *P. monteilii* et *P. mosselii*) produisant de la pyoverdine et des espèces non fluorescentes (*P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. luteola* et *P. oryzihabitans*).

Ces bactéries sont ubiquitaires et certaines espèces sont plus fréquemment rencontrées en médecine humaine (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens* et *P. putida*). D'autres espèces ont été isolées de l'environnement ou sont des phytopathogènes présentant une spécificité d'hôte étroite. Les espèces de *Pseudomonas* pouvant être isolées en pratique médicale sont indiquées dans le tableau 30.24.

L'identification des espèces les plus fréquemment rencontrées est fiable.

P. aeruginosa et groupe « fluorescent »

Habitat et pouvoir pathogène

P. aeruginosa est la bactérie pathogène opportuniste par excellence. Les infections à *P. aeruginosa* surviennent chez des sujets âgés, immunodéprimés (cancéreux), présentant des affections intercurrentes (insuffisance respiratoire, brûlure). Cette espèce est principalement responsable d'infections acquises à l'hôpital : infections de plaies (brûlures, postchirurgicales), infections urinaires (notamment sur sonde), bactériémies (notamment chez le patient neutropénique), pneumonies (notamment sous ventilation mécanique) et méningite postneurochirurgicale. *P. aeruginosa* peut aussi être responsable d'infections communautaires : infections respiratoires chez le patient mucoviscidosique ou bronchopathe chronique, otite maligne externe, kératite ulcéreuse et folliculite. Enfin, *P. aeruginosa* peut également être isolé à partir de selles sans que cette présence soit reliée à un rôle pathogène.

Les souches de *P. aeruginosa* isolées du tractus respiratoire des sujets (plus de 90 %) atteints de mucoviscidose présentent des particularités morphologiques et physiologiques à prendre en compte lors de l'analyse bactériologique (isolement, identification et antibiogramme) des expectorations. Au cours de l'évolution de la mucoviscidose mais aussi de maladies respiratoires chroniques, les colonies isolées présentent des variations de taille (colonies naines à larges) et d'aspect (rugueuses, lisses ou muqueuses). Elles sont le plus souvent muqueuses et apigmentées lors du passage à la chronicité.

Les deux autres espèces les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine du groupe fluorescent (*P. fluorescens*, *P. putida*) demeurent plus rarement isolées (généralement chez l'immunodéprimé) et sont souvent considérées comme des contaminants du fait de leur faculté à se développer à 4 °C.

Caractères bactériologiques

Caractères culturaux

P. aeruginosa cultive facilement sur milieux ordinaires en développant une odeur de seringa. La température optimale de croissance est de 30 °C. Sur milieux solides, trois types de colonies peuvent être observés simultanément ou de manière isolée :

- colonies larges (« la ») de 2 à 3 mm de diamètre, à bord irrégulier, rugueuses, avec une partie centrale bombée présentant des reflets métalliques ;
- colonies plus petites lisses (« S ») bombées à bord régulier ;
- colonies muqueuses (« M »), bombées, coalescentes, filantes, rencontrées chez les souches produisant un *slime* composé d'un polymère exopolysaccharidique appelé alginate.

Pour les souches pigmentées (95 %), les milieux de King A et King B permettent une identification de *P. aeruginosa* par la mise en évidence de la production de deux pigments : la pyocyanine (hydrosoluble) et la pyoverdine (soluble dans le chloroforme), respectivement (Fig. 30.11). D'autres pigments hydrosolubles peuvent être produits parfois de manière transitoire : la pyomélanine brune et la pyorubrine rouge.

À partir de prélèvements polymicrobiens, il est nécessaire d'avoir recours à un milieu sélectif contenant du cétrimide (ammonium quaternaire) associé ou non à de l'acide nalidixique.



Fig. 30.11 **Production de pyocyanine et de pyoverdine caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieux de King A et B (A). La pyocyanine est hydrosoluble (à gauche) et la pyoverdine soluble dans le chloroforme (à droite) (B).**

Tableau 30.24 **Caractéristiques morphologiques et biochimiques des espèces du genre *Pseudomonas.***

Caractères / Espèce	Pigment	Nombre flagelles	Oxydase	Croissance		Réduction	ADH	Hydrolyse			Citrate	Acidification					Remarques
				à 41 °C	à 4 °C	NO3−		Gélatine	Lécithinase	Urée	Simmons	Glucose	Tréhalose	Mannitol	Xylose	Maltose	
P. aeruginosa	PC + PV[c]	1	+	+	−	+	+	+	V	V	+	+	−	+	+	−	10 % de souches apigmentées
P. fluorescens	PV	>1	+	−	+	−	+	+	+	V	+	+	+	+	+	−	
P. putida	PV	>1	+	−	+	−	+	−	−	−	+	+	−	−	+	V	
P. monteilii	PV	>1	+	−	−	−	+	−	−	V	+	+	−	−	−	−	
P. alcaligenes	C	1	+	V	+	V	−	−	−	−	V	+	−	−	−	−	
P. pseudoalcaligenes		1	+	+	+	+	V	−	−	−	V	+	−	−	−	−	
P. stutzeri	C	1	+	V	+	+	−	−	−	−	+	+	−	V	+	+	Amidon +
P. mendocina	C	1	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	−	V	V	−	
P. luteola[a]	C	>1	−	+	+	V	+	V	−	V	+	+	ND	V	+	+	Esculine +
P. oryzihabitans[b]	C	1	−	V	+	−	−	−	−	V	+	+	ND	+	+	+	

+ : positif, – : négatif, V : variable, ND : non déterminé.
Réaction importante
a Appelé aussi *Chryseomonas luteola* (ancien CDC group Ve–1).
b Appellé aussi *Flavimonas oryzihabitans* (ancien CDC group Ve–2).
c PC (pyocyanine), PV (pyoverdine), C (caroténoïde).

Identification

Pour *P. aeruginosa*, devant des souches non pigmentées, le recours à des galeries est nécessaire, mais les résultats obtenus avec celles-ci sont parfois erronés et de plus en plus souvent on doit recourir à d'autres méthodes (séquençage, MALDI-TOF) pour obtenir un diagnostic d'espèces précis, notamment pour les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose. Les caractères différentiels avec les autres espèces du groupe fluorescent et du genre sont indiqués dans le tableau 30.24.

Marqueurs épidémiologiques

Les méthodes phénotypiques de typage disponibles (sérotypie des Ag O et l'antibiotypie) sont utilisées lors d'une première approche. La sérotypie est une réaction d'agglutination sur lame réalisée à partir de colonies prélevées sur gélose qui individualise 16 sérotypes avec le kit le plus utilisé (Biorad). Il existe des réactions croisées entre sérogroupes (souche polyagglutinable) et 10 % des souches sont non agglutinables (souches muqueuses notamment). L'antibiotypie est un marqueur peu discriminant, surtout pour différencier des souches impliquées dans des pathologies chroniques chez des patients soumis à des antibiothérapies répétées qui peuvent avoir une influence sur les résultats de l'antibiogramme.

Les méthodes génotypiques font appel à des techniques développées dans le chapitre concernant la biologie moléculaire à des fins diagnostiques et épidémiologiques. La méthode de référence est l'électrophorèse en champs pulsé. Cependant, cette méthode lourde à mettre en œuvre est souvent précédée par des méthodes utilisant la PCR (par exemple RAPD, ERIC-PCR, rep-PCR, PCR-ribotypie, MLVA et MLST).

Autres *Pseudomonas*

Habitat et pouvoir pathogène

Les autres espèces du genre *Pseudomonas* sont très rarement responsables d'infections humaines. Ces espèces présentes dans l'environnement ont été mises en cause dans diverses infections : endocardites (*P. alcaligenes*, *P. luteola*, *P. mendocina*), pneumonies (*P. stutzeri*), bactériémies (*P. oryzihabitans*, *P. stutzeri*, *P. alcaligenes*, *P. luteola*), infections cutanées (*P. stutzeri*, *P. oryzihabitans*), infections osseuses (*P. luteola*), méningites postopératoires (*P. luteola*, *P. oryzihabitans*).

Caractères bactériologiques

Caractères culturaux

Les colonies de *P. stutzeri* sont rugueuses, striées radialement et ridées. Un aspect polybactérien peut être observé avec des colonies présentes sous forme lisse (S). Quelques souches de *P. luteola* et de *P. oryzihabitans* présentent également un aspect rugueux et sont difficiles à prélever.

Identification

Les principaux caractères permettant de différencier des autres espèces du genre sont indiqués dans le tableau 30.24. À noter que *P. stuzeri* est phénotypiquement hétérogène, ce qui est lié à l'existence d'au moins 9 génomovars (les souches cliniques appartiennent aux génomovars 1 et 2). À noter que *P. luteola* et *P. orizyhabitans* sont les seules espèces présentant une réaction d'oxydase négative.

Genres *Burkholderia, Ralstonia, Pandoraea, Comamonas, Acidovorax, Delftia, Brevundimonas* et *Stenotrophomonas*

Généralités

Les genres *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Pandoraea*, *Cupriavidus*, *Comamonas*, *Acidovorax*, *Delftia*, *Brevundimonas* et *Stenotrophomonas* appartiennent aux groupes génomiques II à V de Palleroni (voir Tableau 30.21) et étaient autrefois classés au sein du genre *Pseudomonas*.

Habitat et pouvoir pathogène

Excepté *Burkholderia mallei*, agent de la morve (maladie spécifiquement équine), ces genres comprennent des bactéries environnementales (eau, sol, plantes) qui survivent en milieu humide et sont sources d'infections à l'hôpital ou chez des patients atteints de mucoviscidose (notamment *Burkholderia cepacia* complex et *Stenotrophomonas maltophilia*).

Deux espèces sont susceptibles de provoquer des infections graves chez l'homme sain (la mélioïdose due à *Burkholderia peudomallei*) ou chez l'animal (la morve due à *B. mallei*). Ces deux espèces sont des agents potentiels de bioterrorisme et doivent faire l'objet, lors de la manipulation des produits pathologiques et des cultures, des précautions d'usage afférentes aux agents infectieux de classe III.

Identification

L'identification à l'aide des galeries biochimiques donne des résultats variables en fonction des genres et espèces considérés : satisfaisants pour certains genres, médiocres pour d'autres (*B. cepacia* complex par exemple).

Burkholderia cepacia complex

Le complexe *B. cepacia* résulte d'un regroupement de bactéries présentant des caractères phénotypiques similaires, mais elles sont génotypiquement individualisées en 18 espèces dont les plus fréquentes sont *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis, B. cepacia* et *B. dolosa*. Les deux premières représentent environ 80 % des souches isolées dans la mucoviscidose tandis que les trois suivantes constituent environ 15 % des cas.

Habitat et pouvoir pathogène

Certaines espèces du genre complexe *B. cepacia,* décrites comme phytopathogènes (riz, oignon), sont des bactéries qui possèdent une grande capacité métabolique d'adaptation (capacité de dégrader des hydrocarbures, des pesticides, synthèse d'agents antifongiques utilisés dans l'agriculture). Ces propriétés qui leur permettent de

survivre dans des environnements hostiles sont à l'origine de leur présence dans l'environnement hospitalier (surfaces, solutions antiseptiques, etc.). De plus, ces espèces sont intrinsèquement résistantes à de nombreuses classes d'antibiotiques et d'antiseptiques.

Les espèces du complexe *B. cepacia* sont des bactéries pathogènes opportunistes dont certains clones ont non seulement une capacité accrue de coloniser puis d'infecter le tractus respiratoire des patients atteints de mucoviscidose, mais aussi une implication dans l'évolution péjorative chez les sujets mucoviscidosiques transplantés. Ce groupe d'espèces est susceptible d'intervenir en tant que pathogènes opportunistes étant à l'origine notamment de bactériémies sur cathéters, d'infections pulmonaires chez les patients intubés-ventilés. À noter que des épidémies hospitalières ont aussi été décrites.

Caractères bactériologiques

Caractères culturaux

Les espèces du complexe *B. cepacia* cultivent sur milieux ordinaires à 30 °C en 48 heures. L'utilisation de milieux sélectifs à partir des expectorations non diluées chez les patients atteints de mucoviscidose est nécessaire. Le milieu BSCA rendu sélectif par la présence de gentamicine et de polymyxine permet une croissance plus rapide de *B. cepacia* (Fig. 30.12), mais ne permet pas la croissance de *B. gladioli* (sensible à la gentamicine), contrairement au milieu OFPBL contenant de la polymyxine et de la bacitracine.

Identification

Dans un premier temps, l'identification peut être réalisée à l'aide d'une galerie API 20 NE®. Cette galerie permet d'identifier correctement la plupart des espèces du complexe *B. cepacia*. Les systèmes récents (Phoenix®, Vitek 2®) produisent une identification correcte pour environ 50 % des souches. Les caractères précisés dans le tableau 30.25 définissent les profils biochimiques de chaque espèce du complexe. Cependant, l'identification devra être confirmée par des techniques moléculaires dans des situations de pathologies chroniques comme la mucoviscidose, ou à partir d'isolats cultivant sur le milieu sélectif BCSA qui appartiennent à d'autres genres phylogénétiquement proches (*Ralstonia, Pandoraea*) et non répertoriés dans les bases de données des systèmes d'identification phénotypiques. La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet d'identifier une grande partie des espèces du complexe *B. cepacia*, mais cela dépend essentiellement de la richesse de la banque de données utilisée.

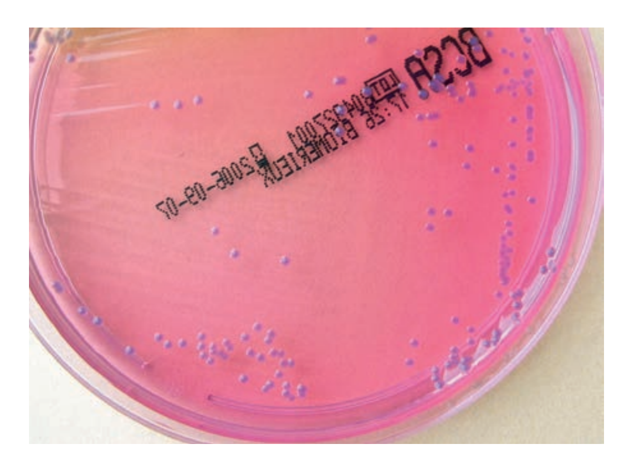


Fig. 30.12 Colonies de *Burkholderia cepacia* sur milieu BSCA rendu sélectif par la présence de gentamicine et de polymyxine.

Autres espèces du genre *Burkholderia*

Habitat et pouvoir pathogène

B. gladioli est une bactérie phytopathogène (glaïeul, oignon, champignon). Chez l'homme, il est rarement responsable d'infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose.

La mélioïdose est une maladie de diagnostic difficile provoquée par *B. pseudomallei* (ou bacille de Whitmore), germe hydrotellurique. Elle est endémique en Asie du Sud-Est (notamment Thaïlande) et dans la partie tropicale du nord de l'Australie (notamment pendant la saison de la mousson), tandis qu'elle est rapportée de façon croissante sur le sous-continent indien et en Amérique centrale et du Sud. C'est une maladie suppurative à symptomatologie polymorphe qui peut se présenter sous formes septiques mortelles, sous formes viscérales localisées (pulmonaires, cutanées, musculaires, viscérales, etc.), après contact cutané, inhalation ou ingestion. Des formes latentes pouvant se réactiver des années après le contact ont été décrites.

La morve provoquée par *B. mallei* a été éradiquée dans les pays développés, mais subsiste en Asie et au Moyen-Orient. Cette maladie peut être transmise à l'homme lors de contacts avec les équidés dans les zoos ou lors de manipulations de laboratoire (infection cutanée). Contrairement à *B. pseudomallei*, il n'y a pas de réservoir environnemental.

Caractères bactériologiques

Caractères culturaux

B. pseudomallei cultive sur milieux ordinaires à 37 °C. Sur milieux solides après 18 heures d'incubation, on observe des colonies de 1 à 2 mm blanchâtres devenant crème à orangé, d'aspect muqueux puis rugueux. En milieu liquide, une odeur de truffe se dégage. La croissance de *B. mallei* est plus lente que celle de *B. pseudomallei.* Sur gélose au sang après 48 heures à 37 °C, les colonies sont rondes et translucides, puis opaques à centre brunâtre.

Identification

L'identification sera conduite d'après les caractères précisés dans le tableau 30.25. Des méthodes d'identification et de détection par PCR ont été utilisées afin notamment de diminuer les risques liés à la manipulation de culture.

Excepté la mobilité, *B. mallei* présente de nombreuses similitudes phénotypiques avec *B. pseudomallei* (Tableau 30.25). Des méthodes moléculaires existent également pour l'identification de ces deux espèces. *B. gladioli* peut être identifié à l'aide de la carte Vitek 2 GN®, mais comme pour les espèces du complexe *B. cepacia*, une confirmation moléculaire est nécessaire. À noter que l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF est possible mais est très dépendante de la banque de données utilisée.

Tableau 30.25 **Caractéristiques morphologiques et biochimiques des espèces des genres *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Comamonas*, *Brevundimonas*, *Ralstonia*, *Pandoraea*, *Sphingomonas* et *Stenotrophomonas*.**

Caractères / Espèce	Pigment[a]	Mobilité	Oxydase	Croissance			Réduction	ADH	LDC	ODC	Hydrolyse				Assimilation					
				à 41 °C	BCSA	cétrimide	NO3−				Urée	Citrate	Gélatine	Esculine	d Glucose	Xylose	Mannitol	Lactose	Maltose	Sucrose
Burkholderia cepacia (complexe)	V	+	+	V	+	V	V	–	V	V	V	+	–	V	+	+	+	+	+	+
Burkholderia gladioli	–	+	–	V	V	–	V	–	–	–	V	+	–	–	+	+	+	–	–	–
Burkholderia mallei	–	–	+	–	ND	–	+	+	–	–	–	–	+	–	+	–	V	–	–	–
Burkholderia pseudomallei	–	+	+	+	ND	–	+	+	–	–	–	+	+	V	+	+	+	+	+	V
Pandorea apista	–	+	V	+	+	+	–	+	–	–	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–
Pandorea pulmonicola	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Pandorea pnomenusa	–	+	V	+	+	V	+	ND	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Pandorea sputorum	–	+	V	V	+	V	V	–	–	–	V	ND	–	–	–	–	–	–	–	–
Ralstonia picketti (2 biovars)	–	+	+	V	+	–	+	–	–	–	+	+	V	–	+	+	–	V	V	–
Ralstonia mannitolilytica	–	+	+	+	+	–	V	–	–	–	+	+	V	–	+	+	+	+	+	–
Stenotrophomonas maltophilia	B	+	–	V	–	–	V	–	+	–	–	V	+	+	+	V	–	V	+	V
Acidovorax delafieldii	J	+	+	V	ND	–	+	+	–	–	+	+	–	–	+	+	V	–	–	–
Acidovorax facilis	–	+	+	–	ND	–	+	+	–	–	+	–	+	–	+	+	+	–	–	–
Brevundimonas diminuta	B	+	+	V	ND	–	–	–	–	–	–	–	V	–	V	–	–	–	–	–
Brevundimonas vesicularis	–	+	+	V	ND	–	–	–	–	–	–	–	V	+	V	–	–	–	+	–
Comamonas acidovorans	–	+	+	V	ND	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–
Comamonas testosteroni	–	+	+	+	ND	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Sphingomonas paucimobilis	J	+	+	+	ND	ND	–	ND	ND	ND	–	–	+	+	+	+	–	+	+	+

+ : positif, – : négatif, V : variable, ND : non déterminé.
a B : brun, J : jaune.
Réaction importante

Genres *Ralstonia, Cupriavidus* et *Pandoraea*

Habitat et pouvoir pathogène

Les espèces du genre *Ralstonia* sont isolées de l'eau (et plus particulièrement des eaux usées, de piscine et minérales), partageant les mêmes niches écologiques que celles du genre *Burkholderia*.

L'espèce *Ralstonia pickettii* (anciennement dénommée *Pseudomonas pickettii* puis *Burkholderia pickettii*) est à l'origine de bactériémies nosocomiales ayant pour origine des solutés (hémodialysés), des respirateurs et des solutions antiseptiques contaminés, mais elle est également responsable de méningites, d'ostéomyélites et d'endocardites. Deux autres espèces sont aussi retrouvées chez l'homme : *R. mannitolilytica* (anciennement *R. pickettii* biovar 3/'thomasii') et *R. insidiosa*. D'autres espèces de *Ralstonia* ont été récemment reclassées dans le nouveau genre *Cupriavidus* : *C. pauculus*, *C. gilardii*, *C. respiraculi* et *C. taiwanensis*. Les espèces du genre *Pandoraea* ont été individualisées du complexe *B. cepacia* lors d'études génomiques sur des isolats de patients atteints de mucoviscidose et de l'environnement. Ce genre comprend cinq espèces (*P. apista*, *P. pulmonicola*, *P. pnomenusa*, *P. sputorum* et *P. norimbergensis*), *P. apista* étant la plus fréquemment isolée. Toutes ces espèces peuvent être isolées également du tractus respiratoire de patients atteints de mucoviscidose.

Caractères bactériologiques

Identification

R. pickettii et *R. mannitolilytica* peuvent être confondues avec *P. fluorescens* par les systèmes d'identification commercialisés (API 20NE®, Vitek®, Phoenix®) et la différenciation biochimique des espèces de *Ralstonia* et *Cupriavidus* est difficile. Le diagnostic d'espèce et les principaux caractères différentiels avec des espèces de genres proches sont indiqués dans le tableau 30.25. Les profils biochimiques des souches de *Pandoraea* sont proches de celles de *Burkholderia* et *Ralstonia*. L'identification moléculaire pour une identification précise à l'espèce est souvent nécessaire. Enfin, la spectrométrie de masse MALDI-TOF semble fiable pour l'identification de ces espèces.

Genres *Comamonas, Acidovorax, Delftia, Brevundimonas* et *Stenotrophomonas*

Habitat et pouvoir pathogène

Les espèces des genres *Comamonas, Acidovorax, Delftia* et *Brevundimonas* sont très rarement isolées en pratique courante (voir Tableau 30.21). Au contraire, *Stenotrophomas maltophilia* est une bactérie ubiquitaire qui colonise le plus souvent les patients par voie exogène. Cette espèce, sous l'effet de la pression de sélection des antibiotiques, est à l'origine de nombreuses infections nosocomiales (deuxième en fréquence parmi les BGN-NF) telles que des bactériémies (notamment chez le patient neutropénique), d'infections pulmonaires (notamment au cours de la mucoviscidose et chez le patient ventilé) et d'infections urinaires (en présence d'une sonde).

Caractères bactériologiques

Caractères culturaux

S. maltophilia produit un pigment brun sur gélose ordinaire sur laquelle la culture est aisée.

Identification

L'identification de *S. maltophilia* – bacille mobile légèrement incurvé, oxydase négative – est aisée à partir des caractères suivants : lysine décarboxylase +, gélatinase +, esculine +, uréase – et indole –. Les souches isolées en pathologie humaine sont souvent multirésistantes aux antibiotiques avec une résistance naturelle aux carbapénèmes. Le diagnostic différentiel avec les espèces bactériennes oxydase négative est présenté dans le tableau 30.26.

Les espèces des genres *Comamonas, Acidovorax, Delftia, Brevundimonas* et *Stenotrophomonas* peuvent être identifiées correctement à l'aide des systèmes commercialisés, avec une préférence pour les systèmes anciens (API 20NE®), les dénominations de la base de données n'étant cependant pas actualisées. Les principaux caractères phénotypiques permettant l'identification de ces genres sont résumés dans le tableau 30.25. La spectrométrie de masse MALDI-TOF et l'approche moléculaire sont des moyens fiables d'identification.

Famille des *Flavobacteriaceae* et autres genres

Généralités

Les espèces pathogènes d'intérêt médical qui appartenaient au genre *Flavobacterium* ont été réassignées dans d'autres genres de la famille des *Flavobacteriaceae* au cours de nombreux changements taxonomiques, limitant ainsi ce genre à des espèces environnementales. La famille des *Flavobacteriaceae* regroupe actuellement les genres *Balneatrix*, *Bergeyella*, *Capnocytophaga* (non traité dans ce chapitre), *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia*, *Empedobacter*, *Flavobacterium*, *Myroides*, *Sphingobacterium*, *Wautersiella* et *Weeksella*.

Habitat et pouvoir pathogène

Les espèces appartenant à ces genres survivent (amibes) et se développent dans différents environnements hydriques (eau de mer pour certaines espèces). Ces bactéries sont également isolées à partir de plantes et d'aliments divers (fruits, légumes). À l'hôpital, ces bactéries sont retrouvées au niveau d'eaux contaminées (robinets, siphons, etc.) ou de matériels nécessitant l'utilisation d'eau (nébuliseurs, dialyse, etc.). Elles sont également isolées dans un contexte d'infections nosocomiales (bactériémies, péritonites) chez des patients qui sont le plus souvent immunodéprimés.

Tableau 30.26 **Caractères différentiels des bacilles à Gram négatif non fermentaires oxydase négative.**

Caractères / Genres ou espèces	Pigment[a]	Mobilité	Croissance		Réduction	LDC	ODC	Hydrolyse			Assimilation					
			à 41 °C	cétrimide	NO_3^-			Urée	Gélatine	Esculine	d Glucose	Xylose	Mannitol	Lactose	Maltose	Sucrose
Acinetobacter spp.	–	–	V	V	V	V	V	V	V	–	V	V	–	V	–	–
Bordetella parapertussis	–	–	–	–	V	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Bordetella holmesii	Brun	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
Pseudomonas luteola	J	+	+	–	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	V
Pseudomonas oryzihabitans	J	+	V	+	–	–	–	+	–	–	+	+	V	–	–	–
Stenotrophomonas maltophilia	B	+	V	–	V	+	–	–	+	+	+	V	–	V	+	V

+ : positif, – : négatif, V : variable, ND : non déterminé.
Réaction importante
a B : brun, J : jaune.

Identification

Les clés d'identification des principales espèces de BGN-NF, isolés en pratique médicale, en dehors des *Pseudomonaceae*, permettent de différencier cinq groupes génétiques différents (Fig. 30.13). À noter que l'identification moléculaire est souvent nécessaire et que la spectrométrie de masse peut s'avérer très utile.

Groupe des BGN-NF oxydase positive – indole positif – immobiles (*Balneatrix*, *Bergeyella*, *Chryseobacterium*, *Elisabathkingia*, *Empedobacter*, *Sphingobacterium*, *Wautersiella*, *Weeksella*)

Habitat et pouvoir pathogène

Les espèces appartenant à ces genres sont des bactéries de l'environnement (sol, plantes et eaux, y compris en milieu hospitalier). Dans ce groupe, *Elizabethkingia meningoseptica* (ex-*Flavobacterium* et *Chryseobacterium meningosepticum*) et *Chryseobacterium* spp. (notamment *C. indologenes*) sont des agents d'infections nosocomiales (méningites, septicémies) qui surviennent à partir de matériel chirurgical contaminé. *E. meningoseptica* est également à l'origine d'infections primitives (méningites néonatales). Les autres genres sont rarement isolés : *Weeksella virosa* dans des prélèvements génito-urinaires mais de pouvoir pathogène incertain, et *Bergyella zoohelcum* dans des pus de morsure. *Balneatrix alpica* a été responsable de cas groupés de pneumonies et méningites dans un centre de cure thermale.

Caractères bactériologiques

Les caractères culturaux et d'identification sont présentés dans le tableau 30.27. Ces bactéries sont pour la plupart pigmentées en jaune. La faible production d'indole doit être réalisée après extraction au xylène. La résistance à la colistine permet également de conforter l'identification de certaines espèces (par exemple *Balneatrix, Chryseobacterium*) qui présentent par ailleurs une sensibilité aux macrolides.

Groupe des BGN-NF oxydase positive – indole négatif – mobiles (*Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Inquilinus*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Shewanella* et *Sphingomonas*)

Habitat et pouvoir pathogène

Les espèces appartenant à ces genres sont assez rarement isolées en clinique et se comportent comme des pathogènes opportunistes pouvant être à l'origine d'infections nosocomiales sur cathéter, le plus souvent chez des sujets neutropéniques, notamment *Achromobacter xylosoxidans* responsable de bactériémies, méningites, pneumonies et péritonites. Plusieurs espèces sont aussi retrouvées chez le patient atteint de mucoviscidose (par exemple *A. xylosoxidans*, *Alcaligenes faecalis*, *Inquilinus limosus*, *R. radiobacter*).

Caractères bactériologiques

Les caractères culturaux et d'identification sont présentés dans le tableau 30.28. À noter que certaines espèces dégagent une odeur fruitée « de pomme » (par exemple *A. faecalis*, *Myroides* spp.). L'identification biochimique

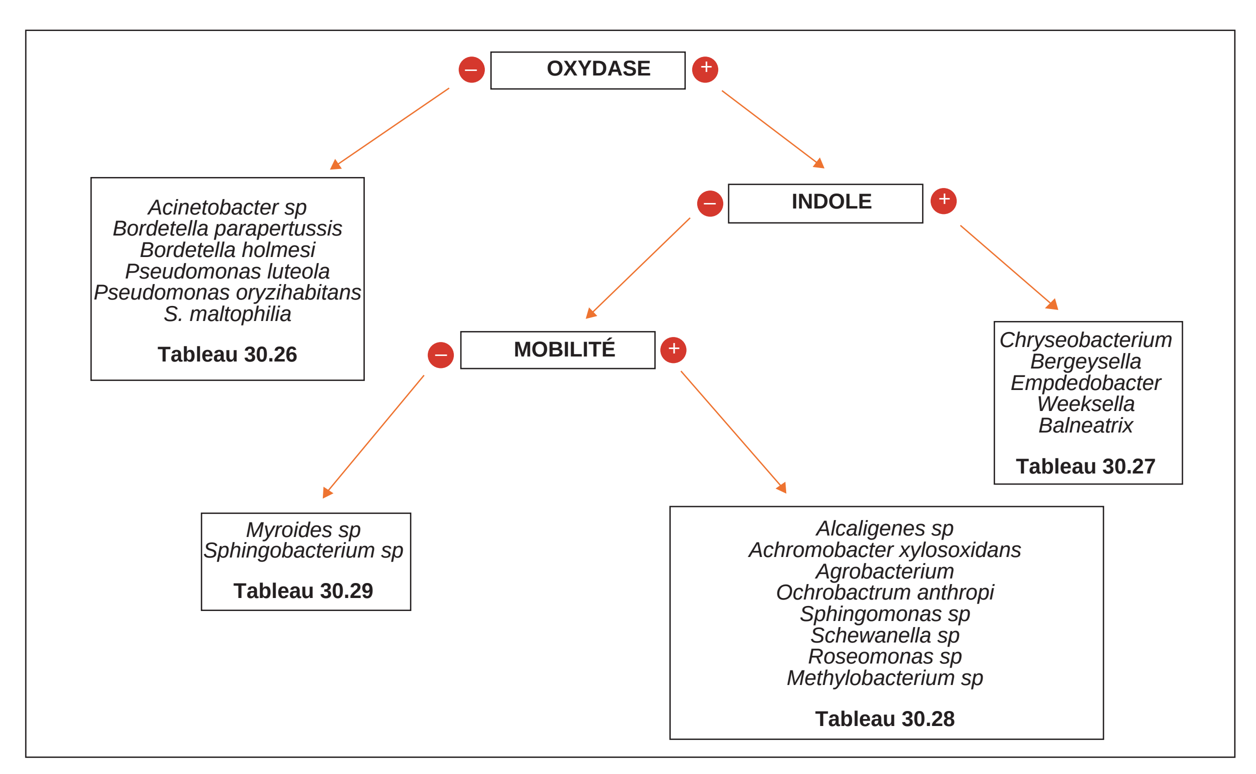


Fig. 30.13 Arbre décisionnel pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires n'appartenant pas aux *Pseudomonaceae*.

Tableau 30.27 **Caractères différentiels des bacilles à Gram négatif non fermentaires oxydase positif, indole positif.**

Caractères / Espèce	Pigment[a]	Mobilité	Oxydase	Production d'indole	Croissance à 41 °C	Réduction NO3–	ONPG	Hydrolyse				Assimilation					Colistine[b]
								Urée	ADN	Gélatine	Esculine	d Glucose	Xylose	Mannitol	Maltose	Sucrose	
Elizabethkingia meningoseptica	J	–	+	+	V	–	+	–	+	+	+	+	–	+	+	–	R
Chryseobacterium indologenes	J	–	+	+	–	–	V	–	–	+	+	+	V	–	+	–	R
Empedobacter brevis	J	–	+	+	–	–	–	–	+	+	–	V	–	–	+	–	R
Bergeyella zoohelcum	–	–	+	+	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	R
Weeksella virosa	J	–	+	+	V	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	S
Balneatrix alpica	J	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	–	+	+	+	ND
CDC groupes IIc, IIe, IIg, IIh, IIi	J	–	+	+	V	–	V	–	V	V	V	V	V	V	V	V	V

+ : positif, – : négatif, V : variable, ND : non déterminé.
Réaction importante
a J : jaune pâle.
b R : résistant, S : sensible.

Tableau 30.28 **Caractères différentiels des bacilles à Gram négatif non fermentaires mobiles, oxydase positif, indole positif acidifiant ou n'acidifiant pas le glucose.**

Caractères / Espèce	Pigment[a]	Mobilité[b]	Oxydase	Production d'indole	Croissance à 41 °C	Réduction NO3–	ONPG	Hydrolyse				Assimilation					Colistine[c]
								Urée	ADN	Gélatine	Esculine	d Glucose	Xylose	Mannitol	Maltose	Sucrose	
Alcaligenes faecalis	–	+	+	–	–	–	ND	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
Achromobacter xylosoxidans subsp. *xyloxosidans*	–	+	+	–	–	V	ND	–	–	–	–	+	+	–	–	+	S
Achromobacter xylosoxidans subsp.*denitrificans*	–	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	
Ochrobactrum anthropi	–	+	+	–	–	V	–	+	–	–	V	+	+	V	V	V	S
Agrobacterium radiobacter	–	+	+	–	–	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	S
Sphingomonas paucimobilis	J	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	+	+	–	+	+	S
Schewanella putrefasciens	B	+	+	–	–	–	ND		+	+	–	V	ND	–	V	V	
Methylobacterium spp.	R	+	+	–	–	–	ND	+	ND	ND	ND	V	V	ND	ND	ND	
Roseomonas spp.	R	+	+	–	+	–	ND	+	–	ND	V	V	V	–	–	–	

Réaction importante

+ : positif, – : négatif, V : variable, ND : non déterminé.

[a] J : jaune pâle, R : rose, B : brun.

[b] Doit être recherchée à température ambiante et à 37 °C.

[c] R : résistant, S : sensible.

Tableau 30.29 **Caractères différentiels des bacilles à Gram négatif non fermentaires immobiles oxydase positif, indole positif acidifiant ou n'acidifiant pas le glucose.**

Caractères / Espèce	Pigment[a]	Mobilité[b]	Oxydase	Production d'indole	Réduction NO3–	ONPG	Hydrolyse				Assimilation			Colistine[c]
							Urée	ADN	Gélatine	Esculine	d Glucose	Xylose	Mannitol	
Myroides odoratus/ odoratimimus	J	–	+	–	–	–	+	+	+	–	–		–	R
Sphingobacterium multivorum	J	–	+	–	–	+	+	–	–	+	+	–	–	R
Sphingobacterium spiritivorum	J	–	+	–	–	+	+	+	V	+	+	+	+	R
Sphingobacterium thalpophilum	J	–	+	–	+	+	+	+	V	+	+	+	–	R
Sphingobacterium mirutae	J	–	+	–	–	+	–	–	–	+	+	+	–	R

+ : positif, – : négatif, V : variable, ND : non déterminé.
[a] J : jaune pâle, R : rose, B : brun.
[b] Doit être recherchée à température ambiante et à 37 °C.
[c] R : résistant, S : sensible.

reste difficile tandis que la spectrométrie de masse MALDI-TOF semble être fiable.

Groupe des BGN-NF oxydase positive – indole négatif – immobiles (*Flavobacterium, Myroides* et *Sphingobacterium*)

Habitat et pouvoir pathogène

Les infections causées par les espèces des genres *Myroides, Sphingobacterium* sont très rares; des infections urinaires sont principalement rapportées.

Caractères bactériologiques

Les caractères culturaux et d'identification sont présentés dans le tableau 30.29. L'identification biochimique reste difficile tandis que la spectrométrie de masse MALDI-TOF semble être fiable.

Groupe des BGN-NF pigmentés en rose (*Asaia, Methylobacterium* et *Roseomonas*)

À noter que les colonies de *C. anthropi* et *E. meningoseptica* peuvent présenter une légère coloration «saumon» sur certains milieux après plusieurs jours d'incubation.

Habitat et pouvoir pathogène

Ces espèces environnementales sont très rarement isolées de prélèvements cliniques, mais peuvent être responsables d'infections nosocomiales chez le patient immunodéprimé.

Caractères bactériologiques

L'identification biochimique reste difficile tandis que la spectrométrie de masse MALDI-TOF semble être fiable.

Pour en savoir plus

Boosshard PP, Zbinden R, Abels S, et al. 16rRNA gene sequencing versus the API 20NE system and the Vitek 2 ID-GNB card for identification of non fermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2006; 44 : 1359–66.

Brooke JS. Stenotrophomonas maltophilia : an emerging global opportunistic pathogen. Clin Microbiol Rev 2012; 25 : 2–41.

Dawson SL, Fry JC, Dancer B. A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent pseudomonads. J Microbiol Methods 2002; 50 : 9–22.

Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting Gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2008; 46 : 3361–7.

Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, et al. Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des souches atypiques de bacilles à Gram négatif non fermentants isolés chez des patients atteints de mucoviscidose. Pathol Biol 2003; 51 : 405–11.

Henry DA, Mahenthiralingam E, Vandamme P, et al. Phenotypic methods for determining genomovar status of the Burkholderia cepacia Complex. J Clin Microbiol 2001; 39 : 1073–8.

Hoiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. Pseudomonas. In : Manual of clinical microbiology. 11th ed. ASM Press; 2015.

Homem de Mello de Souza HA, Dalla-Costa LM, Vicenzi FJ, et al. MALDI-TOF : A useful tool for laboratory identification of uncommon glucose non-fermenting Gram-negative bacteria associated with cystic fibrosis. J Med Microbiol 2014; 63 : 1148–53.

Husson MO, Hamze M, Fruchart A, et al. Pseudomonas Burkholderia Ralstonia et Pandoraea. In : Freney J, Hansen W, Bollet C, Leclerc R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. ESKA; 2003[Section VIII, chap. 4].

Jacquier H, Carbonnelle E, Corvec S, et al. Revisited distribution of nonfermenting Gram-negative bacilli clinical isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 30 : 1579–86.

LiPuma JJ, Currie BJ, Peacock SJ, et al. Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Cupriavidus, Pandoraea, Brevundimonas, Comamonas, Delftia, and Acidovorax. In : Manual of clinical microbiology. 11th ed. Washington DC : ASM Press; 2015.

Marko DC, Saffert RT, Cunningham SA, et al. Evaluation of the Bruker biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of nonfermenting Gram-negative bacilli isolated from cultures from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2012; 50 : 2034–9.

Mellmann A, Cloud J, Maier T, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. J Clin Microbiol 2008; 46 : 1946–54.

Monteil H, Harf-Monteil C. Les bacilles à Gram négatif non-fermentants autres que les Pseudomonas. Paris In : Freney J, Hansen W, Bollet C, Leclerc R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA; 2003[Section VIII, chap. 5].

Ryan MP, Adley CC. Ralstonia spp. : emerging global opportunistic pathogenes. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014; 33 : 291–304.

Vaneechoutte M, Nemec A, Kampfer P, et al. Acinetobacter, Chryseobacterium, Moraxella, and other nonfermentative Gram-negative rods. In : Manual of clinical microbiology. 11th ed. Washington DC : ASM Press; 2015.

Wirsing von Konig CH, Riffelmann M, Coenye T. Bordetella and related genera. In : Manual of clinical microbiology. 11th ed. Washington DC : ASM Press; 2015.

30.5 *Acinetobacter*

T. Lambert

Généralités

Le genre *Acinetobacter* rassemble des bacilles à Gram négatif (avec tendance à la résistance à la décoloration) d'aspect coccoïde en phase stationnaire (1 à 1,5 sur 1,5 à 2,5 µm). Ces bacilles aérobies stricts non pigmentés et non fermentaires sont dépourvus de flagelles, ne réduisent pas les nitrates et ne possèdent pas de cytochrome oxydase. La plupart des souches peuvent se développer entre 20 et 30 °C en milieu minimal additionné d'une source de carbone. Le contenu en GC (guanine-cytosine) est compris entre 36 et 45 % et le test de transformation proposé par Juni a longtemps fait office de référence pour identifier une souche au niveau du genre *Acinetobacter* [1, 3]. Les génomes des différentes espèces ont été récemment caractérisés, permettant d'identifier leurs évolutions [10].

Pouvoir pathogène et habitat

Les *Acinetobacter* sont des micro-organismes ubiquistes de l'environnement naturel et hospitalier, présents dans le sol, l'eau, les milieux aquatiques, les eaux d'égouts; ils peuvent survivre à la fois sur des surfaces humides ou sèches [7]. Certaines espèces ont des particularités remarquables à l'instar d'*A. venetianus* capable de dégrader les hydrocarbures. D'autres espèces font partie de la flore cutanée de l'homme et des animaux, en particulier *A. baumannii*, agent fréquent de colonisation cutanée et de muqueuses chez les patients hospitalisés en unité de soins intensifs. Cette bactérie est aussi responsable d'infections nosocomiales qui concernent essentiellement l'arbre respiratoire, l'appareil urinaire et les plaies, notamment sur cathéter, toutes ces atteintes pouvant provoquer une bactériémie [5–7]. D'autres manifestations cliniques ont été observées : pleurésies, péritonite chez les dialysés, méningites, ostéomyélites, endocardites sur prothèses valvulaires, etc. Ces infections se manifestent souvent par bouffées épidémiques et sont le plus souvent dues à des souches multirésistantes. Un traitement antibiotique, un acte chirurgical et un séjour dans une unité de soins intensifs constituent les principaux facteurs de risque de survenue de ces infections. La prévalence actuelle des infections à *Acinetobacter* est de l'ordre de 9 % dans les centres hospitaliers universitaires, et un peu moins dans les hôpitaux généraux. Plus récemment, cette bactérie s'est illustrée comme une cause d'infection grave avec bactériémie suite à des plaies de guerre lors des conflits en Afghanistan et en Irak et chez les survivants hospitalisés du Tsunami survenu en 2004 en Indonésie [5, 6].

Le genre *Acinetobacter* comprend actuellement 39 espèces désignées par un nom validé par les comités de nomenclature. Le genre *Acinetobacter* est désormais inclus dans la famille des *Moraxellaceae* qui fait partie de l'ordre des *Pseudomonadales*. Les infections humaines sont dues principalement à *A. baumannii*; toutefois, d'autres espèces sont accessoirement impliquées comme : *A. nosocomialis* (anciennement *Acinetobacter* sp.13 TU [Tjernberg et Ursing]), *A. pittii* (anciennement *Acinetobacter* sp.3) et plus rarement *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. parvus*, *A. radioresistens*, *A. schindleri* et *A. ursingi.*

Prélèvements

Les urines, les cathéters, les aspirations bronchiques, les hémocultures constituent les prélèvements les plus fréquents à l'origine de l'isolement des *Acinetobacter*.

Examen direct

Les *Acinetobacter* apparaissent sur les frottis de produits pathologiques colorés par la technique de Gram comme des bacilles à Gram négatif souvent coccoïdes, parfois entourés d'une capsule (Fig. 30.14).

Milieux de culture

L'isolement en milieu solide peut être obtenu après incubation à température comprise entre 30 et 37 °C sur les milieux conventionnels tous germes (gélose au sang, gélose chocolat, gélose trypticase soja, gélose BCP, etc.) et sur les milieux dédiés aux bacilles à Gram négatif comme la gélose de MacConkey ou la gélose de Drigalski. En revanche, la gélose SS ne permet la croissance que de quelques espèces. Les colonies apparaissent en général lactose négatif sur les milieux lactosés car, lorsque l'attaque oxydative du lactose a lieu, celle-ci est souvent retardée. *A. parvus* a la particularité de donner sur gélose TSA des colonies notablement plus petites que les autres espèces d'*Acinetobacter*, et l'utilisation de milieux plus riches comme la gélose TSA au sang ou la gélose chocolat enrichie en facteurs vitaminiques ne permet pas d'augmenter significativement la taille des colonies. Les *Acinetobacter* donnent une réaction d'oxydase négative. À ce stade, l'aspect à la coloration de Gram constitue une bonne orientation diagnostique.

Diagnostic

Diagnostic du genre

Il est en général aisé d'identifier un bacille à Gram négatif coccoïde au niveau du genre *Acinetobacter* par le cumul des caractères aérobie strict, absence de nitrate réductase, réaction à l'oxydase négative, absence de mobilité. Le test de transformation défini par Juni, simple dans sa réalisation, peut servir de référence. Il repose sur la « réparation » d'un mutant auxotrophe pour le tryptophane de la souche spontanément compétente BD413 qui devient prototrophe au contact d'un extrait d'ADN, pourvu que celui-ci provienne d'une souche appartenant au genre *Acinetobacter*.

Diagnostic de l'espèce

L'identification des diverses espèces par les procédés traditionnels est difficile. En routine traditionnelle, l'identification reposait sur la capacité de développement à 37, 41 et 44 °C en bouillon trypticase-soja après 48 heures, l'hydrolyse de la gélatine et les galeries d'identification commercialisées (API 20 NE®, Biolog). Ces procédés ne suffisent pas pour le diagnostic précis de l'espèce; par chance, *A. baumannii*, qui constitue l'espèce de loin la plus distribuée en pathologie humaine, se distingue des autres espèces par sa capacité de développement à 44 °C [1]. Toutefois, certaines souches d'*A. nosocomialis* partagent cette aptitude de croître à 44 °C (Tableau 30.30). L'identification requiert les tests d'assimilation de dérivés carbonés ou le recours à différentes techniques reposant sur l'analyse électrophorétique des protéines d'enveloppe ou d'isoenzymes, l'analyse du polymorphisme de gènes amplifiés (spécifiques de l'ARN 16S, ADN gyrase, RecA, etc.) ou des régions intergéniques 16S–23S [7]. L'ARDRA (*amplified rDNA restriction analysis*) a été particulièrement documentée. En fait, l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF a révolutionné l'identification des espèces tout en épargnant des coûts en temps et en réactifs. Par ailleurs, cette technique s'affine régulièrement grâce à l'enrichissement des banques de données.

Au sein d'*A. baumannii*, 19 biotypes ont été distingués par les tests d'assimilation et 34 sérovars ont été proposés; toutefois, l'identification antigénique n'a pas d'intérêt pratique.

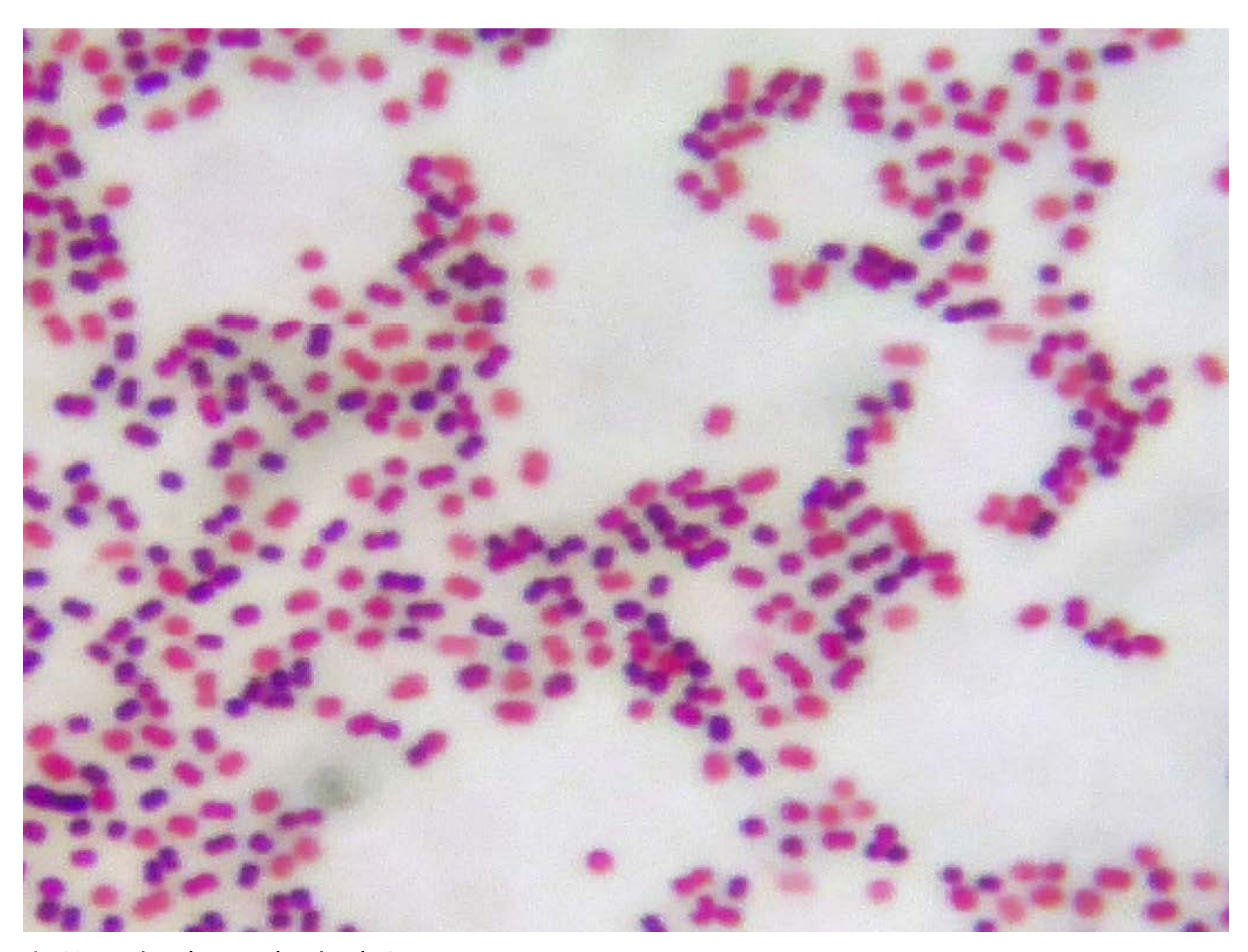


Fig. 30.14 ***Acinetobacter*, coloration de Gram.**

Tableau 30.30 **Caractères différentiels des espèces d'*Acinetobacter* principalement rencontrées en clinique.**

	A. calcoaceticus	*A. baumannii*	*Acinetobacter sp. 3*	*A. haemolyticus*	*A. junii*	*A. johnsonii*	*A. lwoffii*	*Acinetobacter sp.13 TU*
Croissance à 37 °C	+	+	+	+	+	–	+	+
Croissance à 41 °C	–	+	+	–	+	–	–	+
Croissance à 44 °C	–	+	–	–	–	–	–	+/–
Hydrolyse de la gélatine	–	–	–	+	–	–	–	–
Hémolyse	–	–	–	+	–	–	–	–

Recherche de facteurs de virulence

Les *Acinetobacter* sont des bactéries peu pathogènes capables de provoquer des infections chez des patients affaiblis ou suite à une plaie traumatique chez les sujets normaux. De nombreux facteurs de virulence ont été proposés chez *A. baumannii*, à l'instar de la mobilité [2], l'adhésion, la formation de biofilms, des systèmes d'acquisition du fer, de la protéine de membrane externe OmpA, des phospholipases, et les composants du LPS [8]. La mobilité relève d'un processus de *twitching* dû à l'extension et la rétraction de *pili* de type IV; il ne s'agit pas de *swimming* ou de *swarming* qui requièrent des flagelles, puisque *Acinetobacter* en est dépourvu. Le *twitching* est observable par le déplacement des bactéries à la surface de milieux semi-solides; il est détecté chez la plupart des isolats de *A. baumannii* [8]. La mise en évidence de quelques souches immobiles responsables d'infection fait que le rôle du *twitching* dans la virulence reste à ce jour discuté. *A. baumannii* a la capacité remarquable de survivre dans l'environnement hospitalier grâce à son interaction sur différentes surfaces, y compris les substrats abiotiques. Il est suspecté que sa persistance sur les surfaces s'opère par la formation de biofilms; toutefois, le rôle des biofilms en clinique reste à préciser. Les systèmes de

captation du fer dont l'acinetobactine jouent un rôle essentiel dans la virulence d'*A. baumannii*. Le pouvoir pathogène expérimental a été étudié chez la souris grâce à un modèle de pneumopathie obtenu après l'administration intratrachéale d'*A. baumannii*. *Acinetobacter*, à l'instar des autres bacilles à Gram négatif, est doté d'un lipopolysaccharide aux propriétés d'endotoxine. Enfin, la capsule constituée de polysaccharides est un élément majeur de la virulence, protégeant la bactérie de la réponse immunitaire innée de l'hôte.

Sensibilité aux antibiotiques

Il faut considérer la résistance naturelle spécifique à chaque espèce relevant de système d'efflux ou de mécanismes d'inactivation enzymatique des antibiotiques et la résistance acquise portée par des éléments génétiques mobiles. Globalement, les *Acinetobacter* sont résistants à la pénicilline G. La plupart des espèces expriment une céphalosporinase AMPc qui affecte l'activité des céphalosporines de première génération et de l'ampicilline. Les souches protéolytiques d'origine clinique (essentiellement *A. haemolyticus*) sont naturellement résistantes à la tobramycine, la nétilmicine et à l'amikacine par production d'une 6'-*N*-aminoside acétyltransférase plus ou moins fortement exprimée. L'enzyme 3'-aminoside phosphotransférase de type VI inactive la kanamycine et l'amikacine sans affecter la gentamicine, la nétilmicine et la tobramycine. Elle a pour origine *A. guillouiae* ; chez *A. baumannii*, le promoteur natif est modifié par la séquence d'insertion IS*Aba125* venue apporter un motif -35 générant un promoteur hybride qui augmente la transcription du gène *aphA6* (E.J. Yoon et al., communication personnelle). *A. baumannii* a l'étonnante capacité d'acquérir de très nombreux gènes de résistance aux aminosides, ß-lactamines, chloramphénicol, sulfamides, tétracyclines, etc. portés par des éléments mobiles (plasmides, transposons, cassettes d'intégrons et des îlots de résistance). La résistance aux fluoroquinolones, fréquemment observée, résulte principalement de mutations de l'ADN-gyrase. La surexpression de la pompe d'efflux AdeABC est responsable d'une résistance de bas niveau qui affecte l'activité des aminosides, des quinolones, des tétracyclines, y compris la tigécycline, et de certaines ß-lactamines chez de nombreuses souches cliniques [4]. La présence de ß-lactamase à spectre élargi a été décrite chez quelques souches épidémiques. La détection est délicate et elle nécessite la recherche de la synergie acide clavulanique–céphalosporine de troisième génération à l'aide de la technique par diffusion en milieu de Muller-Hinton additionné de cloxacilline afin d'inhiber la céphalosporinase d'espèce qui masque l'effet de l'acide clavulanique. À la différence de l'ertapénème peu actif chez *Acinetobacter*, l'imipénème constitue un antibiotique de référence ; malheureusement, la résistance à ce composé a également été rapportée [7, 9]. Différentes ß-lactamases à activité carbapénèmase ont été rapportées, incluant des enzymes de classe A (KPC et GES), de classe B (VIM, IMP, SIM et NDM) et de classe D (OXA-23, 40, 51, 58 et 143), ce qui peut nécessiter l'utilisation de la colimycine, ou du sulbactam voire aboutir à une situation d'impasse thérapeutique. À noter que OXA-51, doté d'une faible activité carbapénèmase, est intrinsèque et cryptique chez *A. baumannii* ; toutefois, l'insertion d'IS*Aba1* permet son expression. Les souches épidémiques sont généralement multirésistantes, ce qui complique le traitement et explique pour partie le taux élevé de mortalité des infections à *A. baumannii*.

Conclusion

A. baumannii constitue de loin la principale espèce du genre *Acinetobacter* impliquée en clinique et est responsable de près de 10 % des infections nosocomiales. La multirésistance des souches épidémiques nécessite la surveillance de ces infections et la mise en place de mesures prophylactiques seules aptes à lutter efficacement contre cette bactérie.

Références

[1] Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the genus Acinetobacter with the recognition of Acinetobacter baumannii sp. nov., Acinetobacter haemolyticus sp. nov., Acinetobacter johnsonnii sp. nov., and Acinetobacter junii sp. nov. and emended descriptions of Acinetobacter lowffii. Int J Syst Bacteriol 1986 ; 36 : 228–40.

[2] Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in Acinetobacter baumannii. Microbiology 2011 ; 157 : 2534–44.

[3] Kämpfer P, Tjernberg I, Ursing J. Numerical classification and identification of Acinetobacter genomic species. J Appl Bacteriol 1993 ; 75 : 259–68.

[4] Magnet S, Courvalin P, Lambert T. Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in Acinetobacter baumannii strain BM4454. Antimicrob Agents Chemother 2001 ; 45 : 3375–80.

[5] Maragakis LL, Perl TM. Acinetobacter baumannii : epidemiology, antimicrobial resistance and treatment options. Clin Infect Dis 2008 ; 46 : 1254–63.

[6] McConnell MJ, Actis L, Pachón J. Acinetobacter baumannii : human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev 2013 ; 37 : 130–55.

[7] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. Acinetobacter baumannii : Emergence of a successful pathogen. Clin Microb Rev 2008 ; 21 : 538–82.

[8] Peleg AY, de Breij A, Adams MD, et al. The success of Acinetobacter species ; Genetic, metabolic and virulence attributes. PLoS One 2012 ; 7 : 1–11.

[9] Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii : mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006 ; 12 : 826–36 Review.

[10] Touchon M, Cury J, Yoon EJ, et al. The genomic diversification of the whole Acinetobacter genus : origins, mechanisms and consequences. Genome Biol Evol 2014 ; 10 : 2866–82.

30.6 *Bordetella*

F. Garnier, M.-C. Ploy

Généralités

Le genre *Bordetella* regroupe une espèce strictement humaine (*B. pertussis*) et des espèces retrouvées à la fois chez l'homme et l'animal (*B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*,

B. avium, *B. hinzii*, *B. holmesii* et *B. trematum*) ainsi qu'une espèce de l'environnement retrouvée très rarement chez l'homme (*B. petrii*).

Les bactéries du genre *Bordetella* pathogènes pour l'homme sont classiquement de petits coccobacilles à Gram négatif à coloration bipolaire, immobiles, à l'exception de *B. bronchiseptica*.

B. pertussis est très court (0,2 à 0,3 µm × 0,5 à 0,8 µm) et immobile ; d'autres espèces peuvent être plus longues (1 à 2 µm) voire devenir filamenteuses lors des repiquages.

Habitat et pouvoir pathogène

Classiquement, deux espèces de bordetelle sont responsables de la coqueluche : *B. pertussis*, qui est strictement humain, et *B. parapertussis.* La durée des symptômes est moins longue pour la deuxième espèce. *B. parapertussis* est aussi retrouvée chez les ovins.

B. bronchiseptica peut être pathogène pour des hommes fragilisés tels que des immunodéprimés de plus de 45 ans atteints de symptômes respiratoires et souvent fumeurs. Cette espèce se retrouve chez de nombreuses espèces animales.

B. holmesii est de plus en plus isolée. Cette espèce est responsable de bactériémies survenant généralement chez des patients aspléniques ou drépanocytaires, voire sous rituximab. Elle peut aussi être retrouvée dans les prélèvements nasopharyngés de patients atteints de syndromes coquelucheux indistinguables des tableaux provoqués par *B. pertussis*, avec parfois des co-infections *B. holmesii–B. pertussis*. En France, cette espèce n'a jusqu'à maintenant pas été retrouvée chez des enfants de moins de 10 ans ; en revanche, dans une récente étude américaine portant sur 22 cas de bactériémies, les âges vont de 2 à 77 ans (âge moyen 17 ans).

D'autres espèces, telles que *B. avium* et *B. avium-like*, *B. hinzii*, *B. trematum* et *B. petrii*, sont rarement rencontrées ; ce sont des germes opportunistes.

Depuis quelques années, en l'absence de rappel vaccinal chez les adolescents et les adultes, la transmission de *B. pertussis* ne se fait plus d'enfant à enfant, mais d'adultes ou d'adolescents à des nourrissons non vaccinés.

L'expression clinique de la coqueluche, qui est une maladie très contagieuse (R_0 = 15–17), est très variable selon les sujets et on distingue :

- la forme classique typique de l'enfant qui comporte trois phases après une incubation de 7 à 10 jours :
  - phase catarrhale (1 à 2 semaines) avec des signes non spécifiques d'infection des voies aériennes supérieures et une très grande contagiosité ;
  - phase paroxystique (4 à 5 semaines) avec des quintes de toux, reprises inspiratoires sonores (chant du coq), vomissements, cyanose et possibles complications infectieuses ;
  - phase de convalescence (plusieurs semaines voire plusieurs mois).
- la forme du petit nourrisson (< 6 mois) qui peut se traduire par une détresse respiratoire avec défaillance polyviscérale et hyperlymphocytose majeure. Cette pathologie peut être grave voire mortelle ;
- la coqueluche de l'adulte qui est souvent méconnue alors que l'incidence en France est élevée (145/100 000 en 2008–2009) ; elle est très fréquente et doit être évoquée devant une toux persistante durant plus d'une semaine.

Les autres bordetelloses se présentent sous forme de manifestations respiratoires, bactériémiques voire localisées, par exemple auriculaires ou à type de surinfections de blessures.

Prélèvements

Devant une suspicion de coqueluche, le prélèvement biologique doit être réalisé le plus précocement possible. On recommande chez le nourrisson l'aspiration nasopharyngée douce à l'aide d'une sonde molle et fine (Fig. 30.15). Chez les adolescents ou les adultes, une personne entraînée peut réaliser un prélèvement nasopharyngé à l'aide d'un écouvillon en Dacron®. Afin de familiariser les biologistes avec ce genre de prélèvement et d'optimiser les résultats, une vidéo permettant de visualiser la pratique du prélèvement a été réalisée. On ne peut que conseiller sa visualisation sur le site du Centre national de référence (CNR) (http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-reference/les-cnr/coqueluche-et-autres-bordetelloses/envoyer-un-echantillonun-isolat).

Les *Bordetella* autres que *B. pertussis* et *B. parapertussis* sont isolés à partir de divers prélèvements et sont assez souvent des découvertes fortuites car sans éléments cliniques d'orientation préalables. La découverte de *B. holmesii* dans des hémocultures n'est pas exceptionnelle.

Transport

B. pertussis est très fragile et le prélèvement doit être acheminé immédiatement au laboratoire. Le biologiste doit avoir été prévenu afin de préchauffer des milieux de culture pour ensemencer le prélèvement sans délai à son arrivée, moins d'une demi-heure après sa réalisation. Un milieu de transport Amies® avec charbon peut être utilisé si l'acheminement du prélèvement au laboratoire est trop long.

Culture

La culture doit être tentée systématiquement (spécificité 100 %) dans les trois premières semaines de la maladie, même si la sensibilité n'est que de 50 à 60 % durant la 1re semaine de toux et qu'elle diminue fortement ensuite.

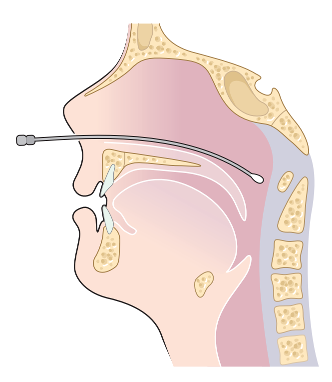


Fig. 30.15 Aspiration nasopharyngée.

La culture se fait en aérobiose et en atmosphère humide sur milieux spéciaux spécifiques des bordetelles à base de pomme de terre : milieux solides de Bordet-Gengou (BG) ou de Regan-Lowe. La sélectivité de ces milieux de culture peut être augmentée par ajout de céphalexine à 40 µg/ml. La température d'incubation est de 35 à 36 °C et les premières colonies hémolytiques n'apparaissent qu'entre 3 et 7 jours. Celles-ci sont classiquement en « gouttelettes de rosée » (Fig. 30.16). Un résultat de culture négative ne peut être rendu qu'après 10 jours d'incubation des milieux.

Le diagnostic d'orientation repose sur des tests assez simples (Tableau 30.31) et l'identification est correctement réalisée par la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

La viabilité des bordetelles est très faible, à l'exception de *B. bronchiseptica*.

À noter que toute souche de *Bordetella* isolée doit être adressée au CNR de la coqueluche et autres bordetelloses. Ces envois permettent au CNR d'étudier la sensibilité des souches aux antibiotiques. De rares souches résistantes à l'érythromycine ont été décrites aux États-Unis, ainsi que le polymorphisme des facteurs de virulence avec la récente description de souches n'exprimant pas la toxine pertussique ou la pertactine.

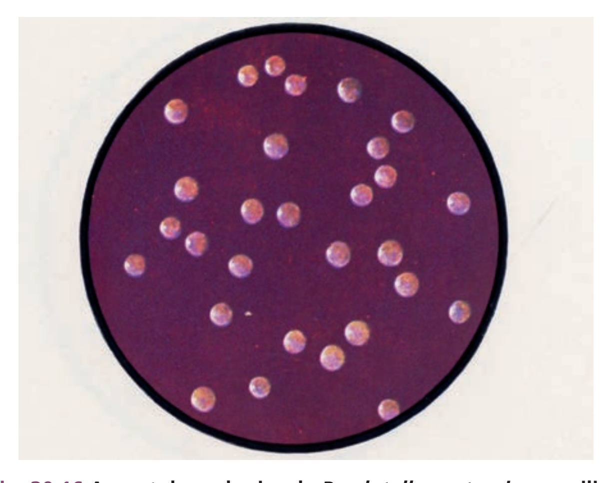


Fig. 30.16 Aspect des colonies de *Bordetella pertussis* sur milieu de Bordet-Gengou à fort grossissement.

Tableau 30.31 **Caractère d'orientation diagnostique des *Bordetella*.**

Caractère	*B. pertussis*	*B. parapertusis*	*B. bronchiseptica*	*B. holmesii*
Délai de croissance sur Bordet-Gengou	3–5 jours	2 jours	1 jour	2 jours
Croissance sur gélose au sang	–	+	+	+
Mobilité	–	–	+	–
Oxydase	+	–	–	–
Uréase	–	+	+	–
Nitrate réductase	–	–	+	–

Recherche de constituants bactériens sans culture par PCR

L'ADN bactérien est recherché par *polymerase chain reaction* (PCR) point final ou par PCR en temps réel pour porter le diagnostic de coqueluche et/ou de *Bordetella* directement sur produit pathologique, prélevé dans les mêmes conditions que pour la culture.

Différentes cibles peuvent être utilisées :

- le promoteur du gène codant la toxine de *Pertussis* : une seule copie par génome, spécifique de *B. pertussis* avec une sensibilité de 65 à 80 % ;
- des séquences d'insertion (IS), présentes en multicopies, de 10 à plusieurs centaines induisant une meilleure sensibilité, 80 à 100 % selon les études :
  - IS*481* permet la détection de *B. pertussis* et *B. holmesii*, mais parfois aussi celle de *B. bronchiseptica* ;
  - IS*1001* permet la détection de *B. parapertussis*, mais aussi celle de *B. bronchiseptica* dans certains cas.

La PCR permet de détecter le génome sur une période de 3 à 4 semaines après le début de la toux. La positivité de la PCR ne saurait préjuger de la viabilité du germe. Cette technique reste la plus performante mais ne permet pas d'isoler la souche. Elle est soit développée localement en recourant à une technique dite « maison » comme celle recommandée lors de la réunion de consensus [1], soit réalisée à l'aide de kits de détection par PCR en temps réel mis sur le marché par différentes firmes. La plupart des kits utilisent IS*481* et IS*1001*, ce qui ne permet pas de distinguer *B. pertussis* et *B. holmesii*. Une PCR dite « maison » peut alors être utilisée pour faire la distinction, mais il est à noter qu'aucune souche de *B. holmessi* n'a été détectée chez des patients de moins de 10 ans en France. De rares kits utilisent une triplex permettant de faire la distinction.

Il est à noter que la PCR *B. pertussis* en association avec la PCR *B. parapertussis* est à la nomenclature depuis la parution du *Journal Officiel* du 15 février 2010 et qu'elle est recommandée chez toute personne ayant des signes cliniques depuis moins de 3 semaines.

Dans l'importante étude de Tiwari et al. portant sur plus de 45 000 cas de coqueluche, les cas mortels ou non ont été confirmés respectivement par culture (54 % versus 49 %) et par PCR (31 % versus 27 %) [2].

Diagnostic indirect : sérodiagnotic

La sérologie n'a d'intérêt qu'après 4 à 5 semaines de toux chez une personne non vaccinée depuis trois ans afin de pouvoir l'interpréter correctement. En effet, les anticorps n'apparaissent véritablement qu'après 4 à 5 semaines de toux avec un pic à 5 à 6 semaines, et leur progression à l'exception du pic est parallèle à celle d'une personne vaccinée depuis moins de 3 ans (Fig. 30.17). Elle ne doit donc jamais être réalisée chez les nouveau-nés, les nourrissons et les enfants ; elle était possible chez les adolescents et adultes après avoir correctement évalué l'intérêt de cette prescription. La technique de référence est la détection par technique ELISA d'IgG anti-toxine *Pertussis* (PT) spécifique de *B. pertussis*

dans le sérum. Actuellement, aucun kit commercial n'est validé en France et seul le CNR la pratique.

Depuis la parution du *Journal Officiel* du 15 février 2010, la sérologie de *B. pertussis* n'étant plus à la nomenclature, elle ne doit plus être réalisée ; elle est remplacée par une PCR pour une recherche simultanée de *B. pertussis* et *parapertussis*.

La place relative des différents éléments du diagnostic en fonction du stade de la maladie est représentée schématiquement à la figure 30.18.

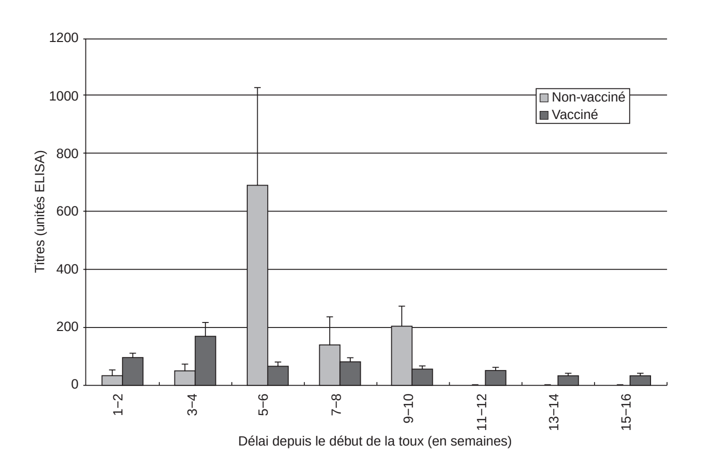


Fig. 30.17 Cinétique d'apparition des anticorps anti-PT (toxine *Pertussis*) après vaccination et après primo-infection. *D'après Simondon F, Iteman I, Preziosi MP, et al. Evaluation of an immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for* Pertussis *toxin and filamentous hemagglutinin in diagnosis of Pertussis in Senegal. Clin Diag Lab Immun 1998 ; 5 : 130-4.*

Sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme n'est pratiqué que par le CNR, mais il faut savoir que les infections à *B. pertussis* sont traitées par les macrolides. De rares souches de *B. pertussis* résistantes à l'érythromycine ont été décrites aux États-Unis et un cas récemment en France. La plupart des fluoroquinolones sont très actives, tandis que les β-lactamines sont sans action. *B. parapertussis* est généralement moins sensible que *B. pertussis*. Quant aux autres *Bordetella*, elles ont des sensibilités comparables aux autres bacilles à Gram négatif non fermentants.

Depuis 2013, la vaccination est recommandée à 2, 4 et 11 mois, puis à 6 ans, 11–13 ans et 25 ans. Vu la gravité de la coqueluche chez les très jeunes enfants, dans les 6 mois de vie (pic de décès entre 2 et 6 semaines de vie), on recommande la vaccination de l'entourage, encore appelé *cocooning* (les parents sont responsables de plus de la moitié des contaminations des nourrissons de moins de 6 mois). La vaccination des femmes enceintes réduit significativement les infections des nouveau-nés.

Vaccins

Il faut rappeler que l'épidémiologie de la coqueluche s'est transformée avec la vaccination, mais que la protection n'est complète que sur une durée de 7 à 10 ans.

Les vaccins à « germes entiers » ont été retirés du commerce et remplacés par les vaccins « acellulaires ». Six protéines sont actuellement bien connues et susceptibles d'induire une protection chez l'homme ; ces antigènes sont la toxine de *Pertussis* (PT), l'adényl cyclase-hémolysine (AC-Hly) et les adhésines telles que l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), la pertactine (PRN) et les *fimbriae* (FIM). Tous les vaccins contiennent au moins la PT et certains une ou plusieurs adhésines (FHA, PRN ou FIM). Il n'existe pas

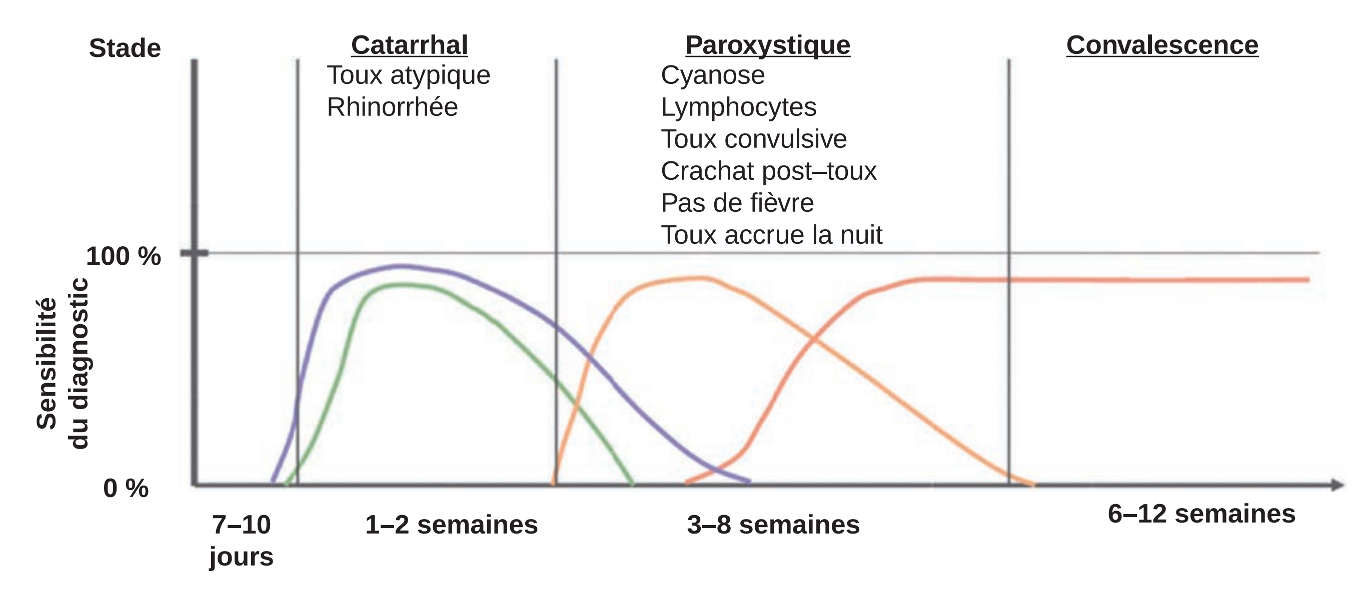


Fig. 30.18 Sensibilité relative de la culture (vert), de la PCR (bleu), de la sérologie (rouge) et du diagnostic clinique (orange) aux différents stades de la coqueluche. *Adapté de A. van der Zee. Clin Microbiol Reviews 2015 ; 28 : 1005-26.*

de vaccin anticoquelucheux seul ; il est toujours combiné avec différentes valences (diphtérie, tétanos, poliomyélite, *H. influenzae* b ou hépatite B), la formule variant selon les spécialités.

Des souches de *B. pertussis* ne produisant pas de toxine pertussique ou de pertactine ont été signalées.

Références

[1] Riffelmann M, Wirsing von Konig CH, Caro V, et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of Bordetella infections. J Clin Microbiol 2005 ; 43 : 4925.

[2] Tiwari TSP, Baughman AL, Clark TA. First pertussis vaccine dose and prevention of infant mortality. Pediatrics 2015 ; 135 : 1–10.

Pour en savoir plus

Avril JL, Dabernat H, Denis F, et al. Bordetella. In : Bactériologie clinique. 3e éd : Ellipses ; 2000b. p. 364–73.

Forsyth K, Plotkin S, Tan T, et al. Strategies to decrease pertussis transmission to infants. Pediatrics 2015 ; 135 : e1476 82.

Grimprel E, Njamkepo E, Begue P, et al. Rapid diagnosis of pertussis in young infants : comparison of culture, PCR and infant's and mother's serology. Clin Diagn Lab Immunol 1997 ; 4 : 723–6.

Guide des vaccinations. 2006. Chap. Coqueluche www.sante.gouv.fr/index.htlm.

Guillot S, Descours G, Gillet Y, et al. Macrolide-resistant Bordetella pertussis infection in newborn girl, France. Emerg Infect Dis 2012 ; 18 : 966–8.

Guiso N. Bordetella. In : Freney J, Renaud F, Bollet C, Leclercq R, editors. Actualités permanentes en Bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2002 [Section VIII, chap. 19].

Haut Conseil de la Santé Publique. Rapport relatif à la conduite à tenir devant un ou plusieurs cas de coqueluche ; 5 septembre 2008, www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/cshpf/hcspr20080905_coqueluche.pdf.

Kosters K, Riffelmann M, Dohrn B, et al. Comparison of five commercial enzyme-linked immunosorbent, assays for detection of antibodies to Bordetella pertussis. Clin Diagn Lab Immunol 2000 ; 7 : 422–6.

Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, et al. Significant finding of Bordetella holmesii DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. J. Clin Microb 2011 ; 49 : 4347–8.

Njamkepo E, Guiso N. Bordetella pertussis. In : Denis F, editor. Les bactéries, champignons et parasites transmissibles de la mère à l'enfant. Montrouge : John Libbey Eurotext ; 2002. p. 163–81.

Pittet LF, Emonet S, Schhrenzel J, et al. Bordetella holmesii : an under-recognised Bordetella species. Lancet Infect Dis 2014 ; 14 : 510–9.

Tartof SY, Gounder P, Weiss D, et al. Bordetella holmesii bacteremia cases in the United States, April 2010-January 2011. Clin Inf Dis 2014 ; 58 : e39–43.

Van der Zee A, Schellekens JFP, Mool FR. Laboratory diagnosis of pertussis. Clin Microbiol Reviews 2015 ; 28 : 1005–26.

Adresse utile

Centre national de référence de la coqueluche et autres bordetelloses
Unité de prévention et thérapie moléculaires des maladies humaines
Dr Nicole Guiso
Institut Pasteur
25–28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris cedex 15
Tél. : 01 45 68 80 05 – Fax : 01 40 61 35 33
E-mail : cnr-bordetella-coqueluche@pasteur.fr

30.7 *Moraxella* et *Oligella*

P. Riegel

Généralités

Le genre *Moraxella* est composé de bactéries à Gram négatif ayant tendance à résister à la décoloration, avec une morphologie pouvant aller de formes bacillaires à des formes coccoïdes, bien que le genre *Branhamella* avec la seule espèce *B. catharralis* ait rassemblé la majorité des formes coccoïdes. Elles sont souvent disposées par paires ou courtes chaînettes. Elles sont immobiles et caractérisées par la présence d'une oxydase et d'un métabolisme oxydatif. Ces caractères permettent de les différencier des *Pseudomonas* et apparentés (le plus souvent mobiles) et des *Acinetobacter* (oxydase négatif). Le genre *Moraxella* contient plus de 20 espèces dont une minorité est isolée en bactériologie médicale. Les bactéries du genre *Moraxella* montrent des formes allongées en regard d'un disque de pénicilline alors que les bactéries du genre *Branhamella* restent de forme coccoïde.

Le genre *Oligella* est constitué de bactéries de forme coccobacillaire et il comprend deux espèces : *O. urethralis* et *O. ureolytica*, les bactéries appartenant à cette dernière espèce étant le plus souvent mobiles. *O. urethralis* n'a pas d'activité nitrate réductase au contraire de la plupart des espèces de *Moraxella* isolées en bactériologie humaine.

Habitat et pouvoir pathogène

Les espèces humaines du genre *Moraxella* appartiennent au microbiote nasopharyngé alors que les bactéries du genre *Oligella* sont décrites comme saprophytes du tractus urinaire. Les infections confirmées à *Moraxella* sont peu fréquentes et sont surtout dominées par les pathologies oculaires : la conjonctivite angulaire contagieuse décrite par Morax et des cas de kératites infectieuses. Dans ce contexte, elles concernent surtout *M. lacunata* et *M. nonliquefaciens*. Les *Moraxella*, notamment *M. osloensis*, peuvent aussi être isolées de divers prélèvements comme des hémocultures ou des prélèvements ostéoarticulaires soit comme des contaminants, soit comme pathogènes opportunistes, notamment chez l'immunodéprimé. Les espèces du genre *Oligella* peuvent être responsables d'infections urinaires, rarement associées à des septicémies ou à des localisations septiques secondaires.

Diagnostic bactériologique

Le diagnostic se fait par culture et identification des bactéries isolées. La PCR du gène de l'ARN16S réalisée directement à partir de prélèvements profonds peut permettre d'identifier fortuitement une espèce du genre *Moraxella* bien différenciée par cette technique moléculaire.

Prélèvements

Les prélèvements oculaires, notamment dans le cas de kératites, doivent permettre d'établir l'existence d'une infection bactérienne et de réaliser l'isolement de la bactérie responsable. Une partie du prélèvement doit être introduite dans un milieu liquide de conservation à but de culture et une autre partie peut être directement apposée sur une lame dans le but d'un examen microscopique. Après coloration, la présence de bacilles à Gram négatif associés à des polynucléaires est un argument important pour confirmer l'infection à ces bactéries (Fig. 30.19).

Isolement et identification

L'isolement de *Moraxella* à partir d'autres prélèvements peut être observé au cours du processus habituel du traitement analytique. Toutes les souches de *Moraxella* sont susceptibles de pousser sur gélose additionnée de 5 % de sang de mouton ou de cheval, certaines poussant mieux sur gélose au sang cuit. La présence de CO_2 n'est pas nécessaire pour la majorité des souches et une température de culture de 35 °C est conseillée sans dépasser 37 °C.

Sur les géloses, les colonies sont translucides à grises, convexes, de petite taille (0,1 à 0,2 mm) en 18 à 24 heures pouvant atteindre un diamètre de 3 mm en 48 heures. Les colonies de *M. nonliquefaciens* peuvent être muqueuses, alors que les colonies de *M. lacunata* sur gélose au sang cuit sont habituellement entourées d'un halo noir. Une hémolyse peut être observée pour certaines espèces rares en bactériologie humaine comme *M. bovis* et *M. caprae*.

L'identification présomptive des genres *Moraxella* et *Oligella* peut être déduite à partir des tests précédemment cités et ceux inclus dans le tableau 30.32. La différenciation des espèces peut être réalisée à l'aide de galeries manuelles miniaturisées (API 20 NE®, ID 32 GN®), les automates proposant le plus souvent un taxon unique *Moraxella* spp. La spectrométrie de masse MALDI-TOF devrait permettre l'identification plus aisée et plus fréquente de ces bactéries, les bases de données étant maintenant bien fournies.

Sensibilités aux antibiotiques

La plupart des souches de *Moraxella* et d'*Oligella* sont sensibles aux pénicillines, céphalosporines, tétracyclines, quinolones, aminosides et rifamycines. Néanmoins, la production de β-lactamase a été signalée pour quelques souches de *M. lacunata* et de *M. nonliquefaciens*. Le traitement des kératites à *Moraxella* est habituellement fondé sur l'administration locale de tobramycine, d'ofloxacine ou d'oxytétracycline ainsi que de ticarcilline en milieu hospitalier.

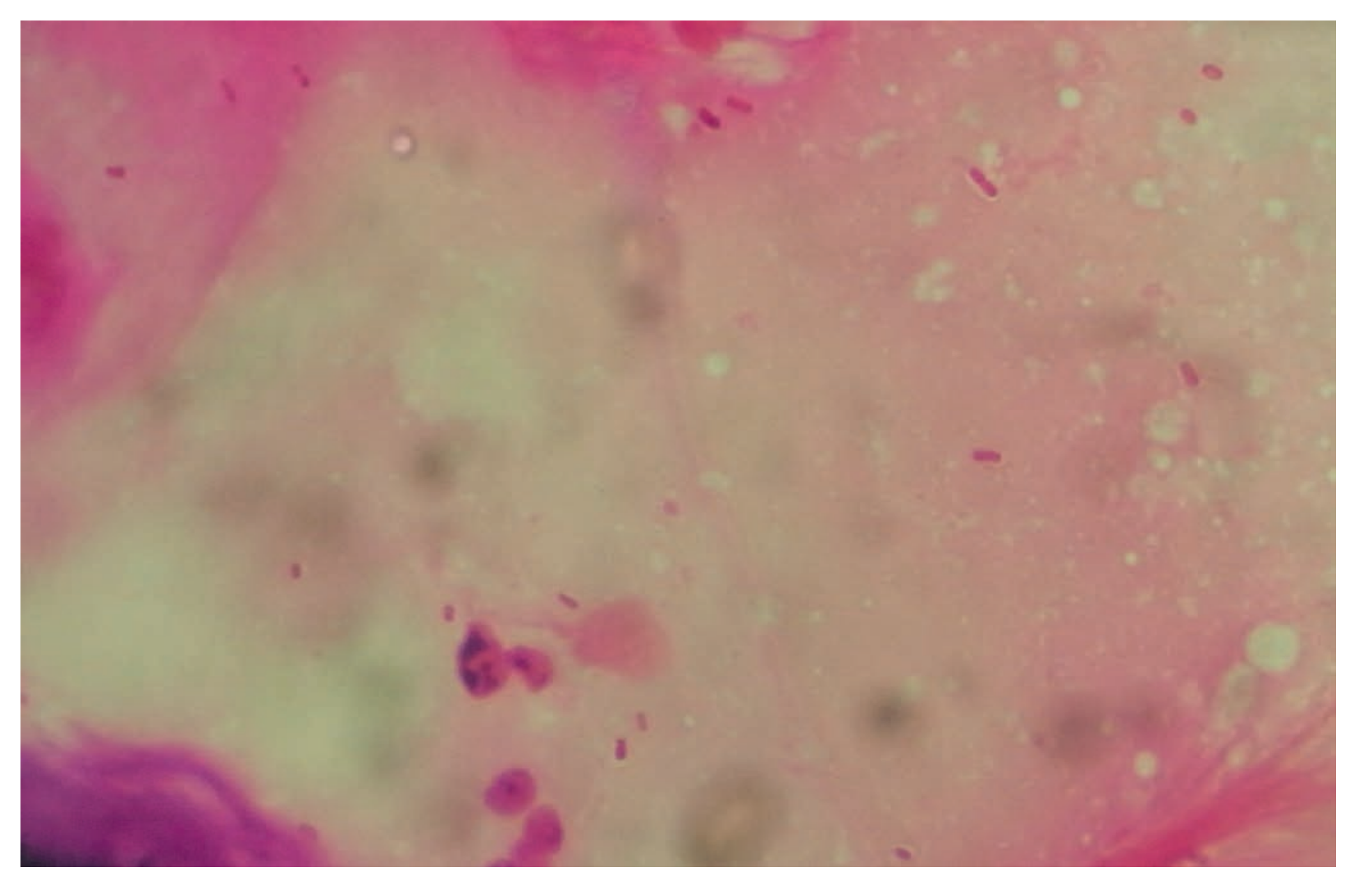


Fig. 30.19 ***Moraxella nonliquefaciens*** **à l'examen direct d'un grattage cornéen.**

Tableau 30.32 **Caractères d'identification des espèces bacillaires de *Moraxella* et des espèces des genres *Oligella* et *Branhamella*.**

Caractères	*Moraxella*							*Oligella*		*Branhamella*
	atlantae	*bovis*	*caprae*	*equi*	*lacunata*	*nonliquefaciens*	*osloensis*	*urethralis*	*ureolytica*	*catarrhalis*
Morphologie	B	B	B	B	B	B	B	CB	CB	C
Isolement	Homme	Animaux	Animaux	Animaux	Homme	Homme	Homme	Homme	Homme	Homme
Hémolyse	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–
Mobilité	–	–	–	–	–	–	–	–	(+)	–
Gélatinase	–	+	–	+	+	–	–	–	–	–
DNase	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
Phénylalanine désaminase	ND	–	–	–	–	–	–	Faible	–	–
Réduction des nitrates	–	(–)	+	–	+	+	(–)	–	+	+
Réduction des nitrites	–	ND	ND	ND	–	–	–	+	+	+

B : bacilles ; C : cocci ; CB : coccobacilles ; ND : non déterminé.
(+) : test positif pour la majorité des souches ; (–) : test négatif pour la majorité des souches.

Pour en savoir plus

Bourcier T. Les infections cornéennes. Paris : Elsevier ; 2004.
Das S, Constantinou M, Daniell M, et al. Moraxella keratitis : predisposing factors and clinical review of 95 cases. Br J Ophthalmol 2006 ; 90 : 1236–8.
Inoue H, Suzuki T, Inoue T, et al. Clinical characteristics and bacteriological profile of Moraxella keratitis. Cornea 2015 ; 34 : 1105–9.
Kodjo A. Genre Moraxella. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de Bactériologie. 2e éd. Paris : ESKA ; 2007.
Sakwinska O, Bastic Schmid V, Berger B, et al. Nasopharyngeal microbiota in healthy children and pneumonia patients. J Clin Microbiol 2014 ; 52 : 1590–4.

30.8 *Francisella*

F. Denis, M.-C. Ploy

Généralités

Les bactéries du genre *Francisella* sont responsables de la tularémie. Ce sont des coccobacilles à Gram négatif (0,2 µm × 0,2 à 0,7 µm), immobiles, aérobies stricts.

Ce sont des pathogènes hautement contagieux dont l'isolement ne peut être réalisé que dans des laboratoires de sécurité de niveau P3.

La difficulté de culture et cette contrainte sécuritaire font que la recherche dans les laboratoires de routine est à proscrire.

Habitat et pouvoir pathogène

Les *Francisella* sont largement distribuées dans l'environnement et peuvent résister plusieurs semaines au moins dans le milieu extérieur ou dans des cadavres d'animaux. Elles infectent de nombreuses espèces animales sauvages ou domestiques.

En France, la répartition géographique est très étendue. On dénombre annuellement une cinquantaine de cas.

La tularémie est due à l'espèce *F. tularensis* qui est un pathogène obligatoire chez l'homme et l'animal. Il existe trois sous-espèces, *tularensis* (type A), *holarctica* (type B) et *mediasiatica*, qui ont une distribution géographique différente.

L'homme se contamine rarement par piqûre de tique (vecteur), le plus souvent par contact direct avec un animal porteur, fréquemment lors du dépeçage de l'animal (lièvre, lapin, etc.), parfois par inhalation, voire ingestion.

Selon la porte d'entrée, on rencontre des formes ulcéro-ganglionnaires (60 à 80 % des cas) des membres (membre supérieur le plus souvent), avec lésions vésiculopustuleuses et adénopathie axillaire volumineuse, des formes oculaires, oropharyngées, pulmonaires, thyphoïdiques, avec rarement une dissémination hématogène.

Certaines souches présentes dans l'eau peuvent être des pathogènes opportunistes chez l'homme (*F. novicida* et *F. philomiragia*).

Diagnostic bactériologique

Diagnostic direct

Prélèvements

La recherche de *Francisella* se fait le plus souvent à partir de lésions cutanées, de ponctions ganglionnaires, plus rarement à partir d'expectorations, de prélèvements conjonctivaux, pharyngés ou d'hémocultures.

Les prélèvements doivent être ensemencés dès réception au laboratoire. S'ils ne sont pas traités sur place, ils peuvent être placés dans des milieux de transport.

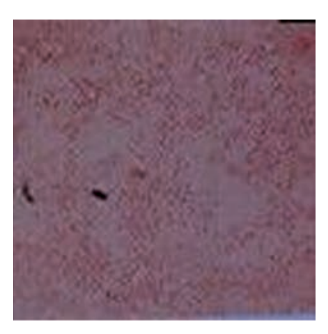


Fig. 30.20 Coloration de frottis révélant la présence de *F. tularensis* sous forme de coccobacilles à Gram négatif. *(Photographie J.-M. Alonso.)*

Culture

L'isolement est difficile car la culture est lente, fastidieuse et peu sensible. On utilise des milieux riches : milieu de Francis, gélose « chocolat » avec Isovitalex®/Polyvitex®, ou milieu *Legionella* BCYE contenant de la cystéine. Les géloses seront incubées pendant 14 jours à 37 °C en aérobiose (l'atmosphère CO_2 n'est pas utile voire néfaste), et normalement les colonies commencent à apparaître au bout de 2 à 3 jours. Les colonies sont de 1 à 2 mm, grisâtres, glaireuses. Après coloration, on observe des coccobacilles à Gram négatif très fins (Fig. 30.20). Il est préférable de réaliser la coloration de Gram avec de la fuchsine plutôt qu'avec de la safranine, les bacilles pouvant être à peine visibles avec une coloration à la safranine.

F. tularensis est oxydase –, faiblement catalase + et possède une β-lactamase, uréase –, et n'est pas exigeant en facteurs X et V. On peut identifier le genre *Francisella* par agglutination avec un sérum spécifique. Il n'existe pas de galeries biochimiques permettant d'identifier les espèces du genre *Francisella*, et les souches doivent être envoyées au laboratoire de référence pour une confirmation de l'identification.

L'identification moderne se fait soit par PCR, soit directement sur la culture après inactivation par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Les souches de *F. tularensis* sont parfois capsulées, immobiles, oxydase –, nitrate réductase –, acidifient le glucose et le maltose, mais pas le saccharose.

On peut rechercher le pouvoir pathogène sur animal (animalerie protégée) notamment sur souris inoculée par voie intrapéritonéale.

Sensibilité aux antibiotiques

À noter que l'activité des β-lactamines est faible. Les souches sont sensibles aux fluoroquinolones, aminosides, tétracyclines, chloramphénicol.

La streptomycine est souvent utilisée, doxycycline ou chloramphénicol étant des alternatives.

Amplification génique

La PCR réalisée sur des prélèvements de lésions cutanées, des ponctions ganglionnaires, voire de sang conservés entre +2 °C et +8 °C permet de pallier les difficultés d'isolement. Une technique de PCR en temps réel permettant de différencier les types A et B a été récemment décrite. La PCR est plus sensible que la culture et a été utilisée à partir de différents prélèvements cliniques, mais il existe des réactions croisées avec *F. novicida*.

Cette technique est réservée aux laboratoires spécialisés. Elle peut être positive même sur des prélèvements réalisés tardivement (> 2 semaines de maladie).

Diagnostic indirect : sérodiagnostic

La sérologie est la méthode de diagnostic de la tularémie la plus utilisée. Les anticorps apparaissent habituellement après 2 semaines d'évolution, avec un pic au bout de 1 à 2 mois ; on utilise le plus souvent une réaction d'agglutination, parfois l'immunofluorescence. Le seuil considéré comme significatif est le 1:160e, mais l'idéal est de disposer d'une paire de sérums prélevés à 15 jours d'intervalle (dont le premier aussi précoce que possible) et d'observer une séroconversion. À noter qu'il existe des réactions croisées avec les *Brucella* mais pas avec *F. novicida* et *F. philomiragia*.

La technique ELISA est peu répandue. Les anticorps peuvent persister 10 ans et la présence d'IgM ne signe donc pas toujours une infection récente.

Au total, le diagnostic direct de tularémie par culture ou PCR est réservé à des laboratoires spécialisés (sécurité niveau P3) et la très grande majorité des diagnostics est portée par la sérologie. Du fait de la difficulté du diagnostic, les résultats doivent toujours être confrontés à la clinique.

Pour en savoir plus

Avril JL, Dabernat H, Denis F, et al. Francisella tularensis. In : Bactériologie clinique. Paris : Ellipses ; 2000c. p. 374–7.

Durand G, La Scola B, Lecostumier A, et al. Francisella tularensis. In : Rémic. 5e éd Société Française de Microbiologie ; 2015. p. 503–6.

Kugeler KJ, Pappert R, Zhou Y, et al. Real-time PCR for Francisella tularensis types A and B. Emerg Infect Dis 2006 ; 12 : 1799–801.

Maurin M. Francisella. In : Freney J, Renaud F, Bollet C, Leclercq R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2003 [Section VIII, chap. 7].

Thalhammer F, Eberl G, Kopetzki-Kagler U. Detection of Francisella tularensis in clinical specimens by use of polymerase chain reaction. Clin Infect Dis 1998 ; 26 : 764–5.

Adresse utile

Centre national de référence *Francisella tularensis*
Pr Max Maurin
CHU de Grenoble, service de bactériologie et virologie
BP 217, 38043 Grenoble cedex
Tél. : 04 76 76 54 79 – Fax : 04 76 76 59 12
E-mail : mmaurin@chu-grenoble.fr

30.9 *Pasteurella*

F. Denis, M.-C. Ploy

Généralités

Les *Pasteurella* sont des petits bacilles à Gram négatif à coloration habituellement bipolaire qui ont une forme allant de coccobacilles (0,3 à 1 µm) à des aspects plus longs (2 à

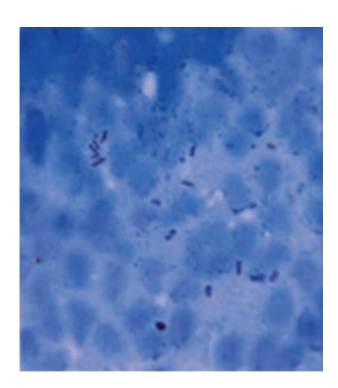


Fig. 30.21 **Frottis de sang de cobaye montrant des *Pasteurella*.**

5 µm) (Fig. 30.21). Les chaînettes sont rares. Ce sont des bactéries immobiles.

La température de croissance optimale est de 37 °C. Ce sont des bactéries aéro-anaérobies dont la croissance est accrue en microaérophilie. Elles sont le plus souvent oxydase + et catalase +. Toutes les souches sont sensibles au composé vibriostatique O129.

Quatre espèces sont principalement impliquées en pathologie humaine : *P. multocida*, *P. dagmatis*, *P. canis* et *P. stomatis*, avec une nette prédominance de la première espèce. L'espèce *multocida* est divisée en trois sous-espèces : *multocida*, *septica*, *gallicida*.

Habitat et pouvoir pathogène

Les *Pasteurella* sont des bactéries commensales du rhinopharynx de nombreux animaux, notamment de mammifères et d'oiseaux.

Elles peuvent survivre dans le milieu extérieur.

Les pasteurelloses d'inoculation sont assez fréquentes (100 à 500 cas par million d'habitants et par an en France), consécutives le plus souvent à des morsures de chiens (80 %) ou de chats, ceux-ci étant pour près de la moitié d'entre eux porteurs asymptomatiques au niveau de la cavité buccale ; mais griffures ou léchages sont parfois à l'origine de l'infection (6 % des cas).

La forme aiguë est caractérisée par la brièveté de l'incubation (quelques heures), avec des douleurs très vives qui irradient très vite au membre concerné ; la plaie est rapidement inflammatoire et œdématiée avant extension, à type de lymphangite. La fièvre est inconstante. Il existe des formes subaiguës.

Le facteur majeur de pathogénicité est supporté par une toxine peptidique codée par le gène *tox A*, toxine qui a un pouvoir dermonécrotique et ostéolytique.

En dehors des pasteurelloses d'inoculation, on peut observer des septicémies, des endocardites, des formes pleuropulmonaires, des méningites et des manifestations diverses purulentes, les formes avec hémocultures positives survenant surtout chez des patients cirrhotiques ou ayant des cancers, notamment pulmonaires.

Dans tous les cas, *P. multocida* arrive en première place (près des trois quarts des souches isolées chez l'homme).

Diagnostic bactériologique direct

Prélèvements

Pour les formes locales ou locorégionales, on prélève précocement, avant mise sous traitement, la sérosité au niveau de la porte d'entrée en pressant si possible les berges.

On utilise soit un écouvillon, soit une ponction à l'aiguille fine. L'acheminement doit être rapide ou, à défaut, on a recours à un milieu de transport.

Pour les formes systémiques, le diagnostic est le plus souvent porté lors d'une découverte fortuite à partir d'hémocultures, de cultures de LCR, de liquide pleural, de prélèvements respiratoires. L'orientation diagnostique se fait essentiellement d'après les renseignements cliniques, la notion de morsure animale étant primordiale.

La coloration de frottis réalisée à partir du produit pathologique montre rarement des aspects évocateurs.

Isolement et identification

Il est indispensable d'ensemencer deux types de milieux enrichis :

- une gélose au sang cuit incubée à 37 °C sur 72 à 96 heures en atmosphère de CO_2 ;
- une gélose au sang incubée en anaérobiose pendant au moins 48 heures à 37 °C.

Par ailleurs, on peut recourir à un milieu sélectif contenant 2 mg/l d'amikacine et 4 mg/l de vancomycine pour les prélèvements que l'on soupçonne d'être polymicrobiens. À noter que les *Pasteurella* ne poussent pas sur milieu au citrate de Simmons et généralement pas sur gélose de MacConkey.

Sur gélose au sang cuit, les colonies lisses peuvent atteindre un diamètre de 2 mm en 48 heures ; elles sont grisâtres ou jaunâtres (Fig. 30.22). Les souches capsulées sont muqueuses. Sur gélose au sang, on n'observe pas d'hémolyse. En bouillon, un trouble homogène apparaît en 24 heures. En gélose VF, la croissance est augmentée dans la zone de microaérophilie.

La nature du prélèvement, l'examen direct (petits bacilles à Gram négatif à coloration bipolaire immobiles avec un aspect en navette) (Fig. 30.22) et les caractères oxydase + (avec réactifs au tétraméthyl-p-phénylènediamine), nitrate-réductase +, la fermentation du glucose, l'absence de LDC, d'ADH, de gélatinase et la sensibilité au O129 (2,4 diamino-6, 7 diisoprophyl-ptéridine) par la méthode des

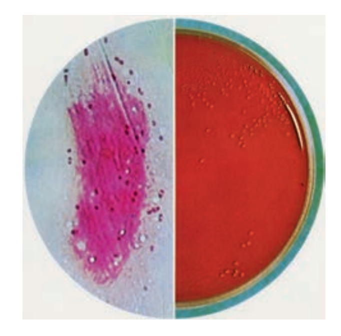


Fig. 30.22 **Coloration de Gram montrant *P. multocida* à gauche, l'aspect des colonies sur gélose au sang à droite.**

Tableau 30.33 **Caractères distinctifs entre les principales espèces de *Pasteurella* et apparentées, dont *Mannheimia*.**

	Sensibilité au O129	ODC	Indole	Uréase	Fermentation		
					Glucose	Maltose	Mannitol
P. multocida	+	+	+	–	+	–	+
P. canis	+	+	d	–	+	–	–
P. dagmatis	+	–	+	+	+ gaz	+	–
P. stomatis	+	–	+	–	+	–	–
« P. » pneumotropica	+	+	+	+	+	d	–
M. haemolytica	+		–	–	+	+	+

Tableau 30.34 **Caractères distinctifs de trois sous-espèces de *P. multocida*.**

Sous-espèce de *P. multocida*	Sorbitol	Dulcitol
multocida	+	–
septica	–	–
gallicida	+	+

disques (sensibilité retrouvée également pour *Actinobacillus*) permettent une orientation diagnostique.

Les milieux usuels d'identification des *Enterobacteriaceae* conviennent parfaitement à l'identification des *Pasteurella* : galerie API 20E®, automates Vitek®, etc. Les principaux caractères conduisant au diagnostic d'espèce sont recensés dans le tableau 30.33. La spectrométrie de masse permet un bon diagnostic de l'espèce *Pasteurella multocida*.

On peut arriver au diagnostic de sous-espèces de *P. multocida* (Tableau 30.34).

Sur les cinq types capsulaires reconnus au sein de l'espèce *P. multocida* désignés par les lettres A à F, seuls les types A et D ont été isolés chez l'homme. On peut les caractériser à l'aide de méthodes immunologiques ou par détection des gènes spécifiques par PCR.

Sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme par la méthode des disques doit être réalisé sur Mueller-Hinton supplémenté par 5 % de sang ou de sérum, en utilisant un inoculum à 10^6 bactéries/ml à partir d'un bouillon de 18 heures ou une suspension ajustée à 0,5 de l'échelle de MacFarland. Les boîtes sont incubées 18 à 24 heures à 35 °C. La méthode E-test® peut être utilisée en routine.

Les pasteurelles sont habituellement sensibles à la pénicilline G et à l'ampicilline, mais des β-lactamases ont été décrites de type ROB-1 ou TEM-1, et elles doivent être systématiquement recherchées grâce au test à la nitrocéphine. Ces enzymes sont inactivées par l'acide clavulanique. Les céphalosporines de troisième génération sont actives, de même que les fluoroquinolones et le cotrimoxazole. Les aminosides ont une activité modérée ; si 80 % des souches sont sensibles à la gentamicine, la plupart sont intermédiaires ou résistantes à l'amikacine.

Diagnostic indirect : sérodiagnostic

Le sérodiagnostic repose sur la mise en évidence d'anticorps dirigés contre la capsule et le lipopolysaccharide (LPS). Le sérodiagnostic a peu d'intérêt en pratique, vu sa faible sensibilité.

Pour en savoir plus

Avril JL, Dabernat H, Denis F, et al. Pasteurella. In : Bactériologie clinique. Paris : Ellipses ; 2000d. p. 260–7.

Donnio PY. Pasteurella. In : Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2006 [Section VIII, chap. 17].

Donnio PY. Pasteurella. In : Courvalin P, Leclercq R, editors. Antibiogramme. 3e éd. Paris : ESKA ; 2011. p. 565–7.

Lemenand O, Donnio PY, Avril JL. Pasteurelloses. In : Maladies infectieuses. EMC. Paris : Elsevier SAS ; 2006 8-035-C-10.

30.10 *Haemophilus*

O. Gaillot

Généralités

Les bactéries du genre *Haemophilus* sont de petits bacilles à Gram négatif, immobiles et non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs, dont l'aspect pléomorphe peut aller du coccobacille (0,3 × 0,5 µm) à des formes filamenteuses de plus de 10 µm de long. Leur température optimale de croissance est comprise entre 35 et 37 °C, à l'exception notable de *H. ducreyi* qui requiert plutôt 33 à 35 °C.

Le genre *Haemophilus*, dont l'espèce type est *H. influenzae*, est en 2016 constitué de 13 espèces dont le principal caractère commun est de nécessiter un apport exogène de NAD (facteur V) et/ou de protohème (facteur X) pour croître (Tableau 30.35). Il s'agit cependant d'un ensemble hétérogène au sein de la famille des *Pasteurellaceae* (Fig. 30.23), en dépit de remaniements taxonomiques ayant par exemple conduit à l'individualisation du genre *Aggregatibacter*. Ainsi, *H. felis*, *H. haemoglobinophilus*, *H. paracuniculus* et *H. parasuis* sont des espèces animales dont l'appartenance au même genre que *H. influenzae* n'est pas justifiée génétiquement.

Tableau 30.35 **Caractères principaux d'identification des espèces humaines d'*Haemophilus*.**

Espèce	Exigence en		Test ALA[a]	Hémolyse bêta	Catalase	Tryptophanase (production d'indole)	Uréase	Bêta-galacto-sidase	Acidification à partir du		
	X	V							Sucrose	Mannose	Lactose
H. influenzae/*H. aegyptius*	+	+	–	–	+	d	d	–	–	–	–
H. haemolyticus	+	+	–	d[b]	+	d	+	–	–	–	–
H. parainfluenzae	–	+	+	–	+	d	d	+	+	+	–
H. pittmaniae	–	+	+	+	+	–	–	+	+	+	–
H. parahaemolyticus/ *H. paraphrohaemolyticus*	–	+	+	+	+	–	+	–	+	–	–
H. sputorum	–	+	+	+	+	–	+	+	+	–	–
H. ducreyi	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–

[a] Test de synthèse des précurseurs de l'hème à partir de l'acide δ-aminolévulinique.
[b] Caractère variable selon le biotype ou la souche.

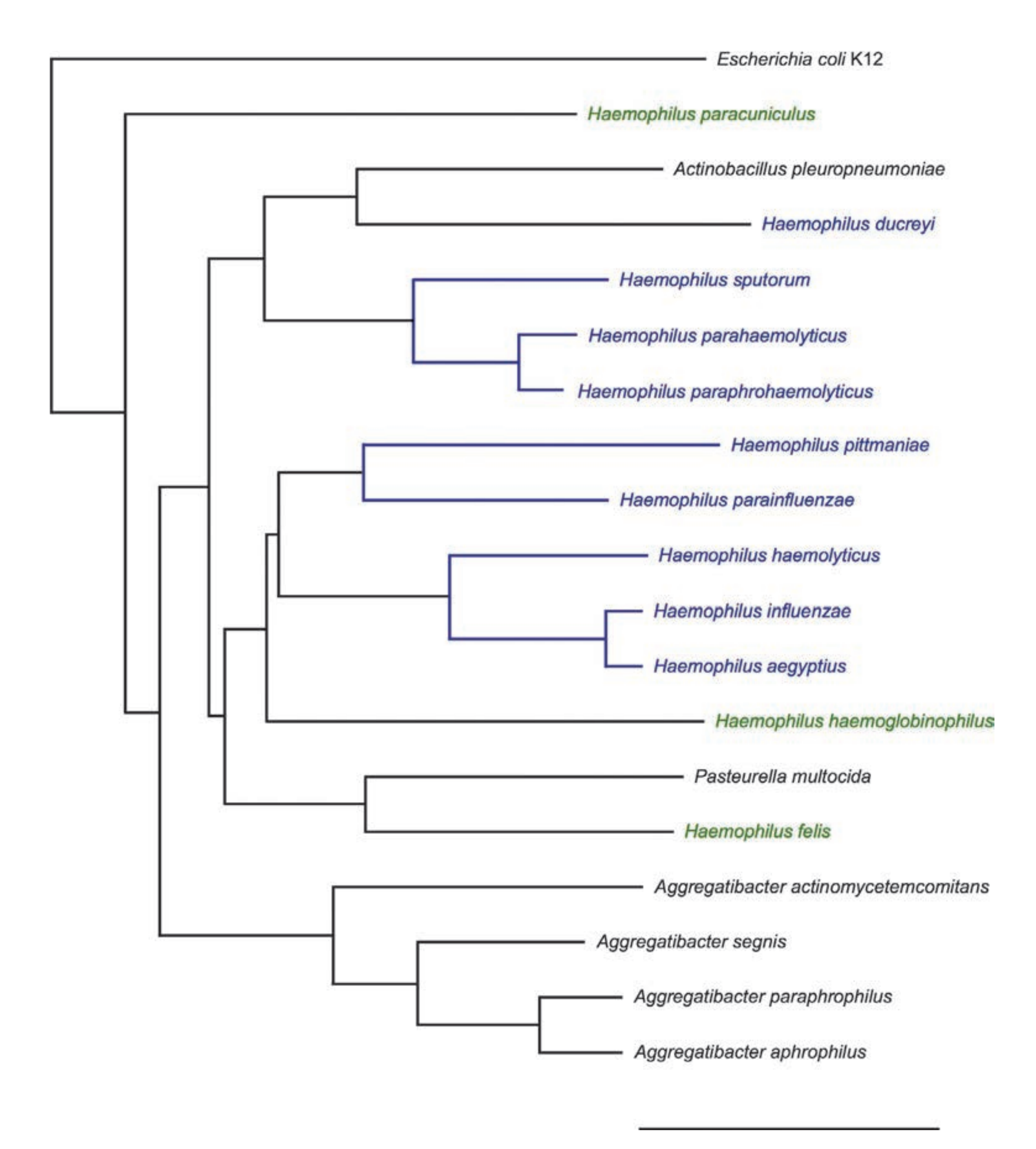


Fig. 30.23 **Arbre phylogénétique montrant les relations des séquences du gène *sodA* des 13 espèces d'*Haemophilus* (en bleu, espèces humaines; en vert, espèces animales) et des souches types des principaux genres des *Pasteurellaceae*.** Barre d'échelle : différence de 10 % entre séquences nucléotidiques.

Quant aux 9 espèces présentes chez l'homme et qui font l'objet de ce chapitre, elles forment au moins trois groupes phylogénétiques distincts : le groupe *influenzae* (*H. influenzae/aegyptius* et *H. haemolyticus*), le groupe *parainfluenzae* (*H. parainfluenzae* et les espèces hémolytiques *H. parahaemolyticus/paraphrohaemolyticus*, *H. pittmaniae* et *H. sputorum*) et *H. ducreyi*.

Habitat et pouvoir pathogène

À l'exception de *H. ducreyi*, les *Haemophilus* dont l'hôte naturel est l'homme font partie de la flore normale des voies aériennes et de l'oropharynx. Ils adhèrent à l'épithélium des muqueuses, y compris parfois au niveau génital où les espèces du groupe *parainfluenzae* sont assez souvent présentes.

H. influenzae est un commensal habituel de l'homme, plus de 80 % des individus étant colonisés. C'est aussi un pathogène pyogène important qui exprime, de façon variable selon les souches, des facteurs de virulence en général absents des autres espèces du genre : *pili* et adhésines de la membrane externe, responsables de l'adhésion à la mucine et aux épithéliums, protéase sécrétée clivant les IgA1 des muqueuses, lipooligosaccharide capable d'induire la formation d'un biofilm et dont la variabilité antigénique contribue à l'échappement à la réponse anticorps, et enfin capsule polysaccharidique (6 sérotypes, de a à f) produite par une minorité de souches, mais à l'origine des infections les plus graves.

On distingue deux catégories d'infections à *H. influenzae* : invasives (méningites, pneumonies bactériémiques, septicémies sans point d'appel, cellulites dont des épiglottites, arthrites et ostéomyélites) et non invasives (otites moyennes aiguës, conjonctivites, sinusites, bronchopneumonies, infections du per partum).

Jusqu'à la fin du XXe siècle, plus de 95 % des infections invasives étaient dues à des isolats capsulés du sérotype b (Hib) dont la capsule de polyribosylribitol phosphate est particulièrement antiphagocytaire. La vaccination systématique anti-Hib des nourrissons depuis 1993 a spectaculairement réduit l'incidence des méningites, épiglottites et pneumonies bactériémiques dans les nombreux pays où elle a été conduite, et Hib n'y est plus que rarement isolé. En France, où l'incidence des méningites à *H. influenzae* est passée de 0,6 à 0,08 pour 100 000 habitants/an entre 1993 et 2010, les infections invasives à *H. influenzae* résiduelles sont dues à plus de 80 % à des isolats *non capsulés* (dits aussi non typables). Les souches capsulées restantes sont principalement de sérotypes f et e. En dépit de sa rareté, Hib reste cependant le plus délétère des sérotypes chez le jeune enfant (6 mois à 2 ans). D'une virulence proche de Hib, le sérotype a (Hia) est à l'origine d'infections de gravité similaire, exceptionnelles en France métropolitaine, mais prévalentes dans certaines populations aborigènes (Amérique du Nord, Australie, Amérique amazonienne, océan Indien). Les sérotypes c et d ne sont en revanche à peu près jamais isolés, y compris en portage. Il faut enfin mentionner l'émergence au Brésil, entre 1984 et 1993, d'un clone de *H. influenzae* (dénommé *H. influenzae* du biogroupe *aegyptius*), non capsulé mais d'une exceptionnelle virulence, responsable de purpura fulminans sans méningite et mortel dans 70 % des cas chez de jeunes enfants à la suite d'une conjonctivite.

Les infections non invasives sont à peu près toujours dues à des isolats non capsulés. Chez l'enfant de moins de 5 ans, les otites moyennes aiguës (souvent associées à une conjonctivite) sont un problème de santé publique. Les souches responsables des formes récidivantes forment des biofilms adhérant à la muqueuse de l'oreille moyenne et résistent souvent au traitement antibiotique en raison d'une sensibilité diminuée aux β-lactamines. Chez l'adulte, les bronchopneumonies à *H. influenzae* surviennent sur des terrains fragilisés (pathologies respiratoires obstructives, ventilation assistée, infection virale respiratoire préalable). La résistance émergente aux fluoroquinolones et aux β-lactamines (y compris in vitro aux céphalosporines de 3e génération) de souches isolées dans ce contexte pourrait devenir préoccupante, d'autant que leur transmission nosocomiale a été documentée. *H. influenzae* est également responsable de sinusites, seul ou en association avec d'autres bactéries.

Les infections maternofœtales à *H. influenzae* sont de plus en plus fréquentes en Europe. Si la plupart surviennent per partum, il existe aussi des infections placentaires provoquant avortement spontané précoce ou mort fœtale in utero. Les isolats responsables appartiennent très majoritairement aux biotypes I, II et III (voir plus loin).

H. haemolyticus, bien que très voisin de *H. influenzae*, est dépourvu d'IgA protéase et n'est jamais capsulé. Son pouvoir pathogène est à ce jour anecdotique (bactériémies sans point d'appel). Les souches de « *H. influenzae* du biotype IV » parfois isolées d'un portage vaginal appartiennent en réalité à l'espèce *H. haemolyticus*.

H. parainfluenzae est un commensal oropharyngé banal, sans réel pouvoir pathogène respiratoire. En revanche, c'est un agent d'endocardite (le H de l'acronyme HACEK) et d'urétrites subaiguës ou chroniques chez l'homme. Chez la femme, c'est un colonisant vaginal assez fréquent, qui peut être retrouvé dans les flores polymicrobiennes d'infections pelviennes. Les espèces proches (*H. parahaemolyticus*, *H. pittmaniae* et *H. sputorum*) sont exceptionnellement responsables d'infections, et sont surtout identifiées au niveau pharyngé en raison de leur morphotype colonial β-hémolytique similaire à celui de *Streptococcus pyogenes* sur gélose au sang.

H. ducreyi est l'agent du chancre mou, ulcère génital des régions tropicales transmis sexuellement, en régression depuis les années 1990. Il est aussi l'agent émergent d'ulcérations cutanées chroniques chez l'adulte et l'enfant dans les îles du Pacifique Sud et en Afrique de l'Ouest.

Diagnostic bactériologique

Prélèvements

La réalisation d'hémocultures est indispensable au diagnostic des infections invasives, en plus de prélèvements spécifiques de chaque présentation clinique (ponction lombaire, de liquide articulaire, prélèvements pulmonaires protégés, prélèvements chirurgicaux, etc.). Elle est cruciale pour le diagnostic des cellulites (périorbitaire et épiglottite notamment), des ostéomyélites à *H. influenzae* et des endocardites à *H. parainfluenzae*. L'analyse du liquide gastrique chez le

nouveau-né, du liquide amniotique et du placenta chez la mère permet le diagnostic des infections maternofœtales. Les produits d'autopsie contribuent au diagnostic des cas de mort in utero.

Selon la localisation des infections non invasives, on procèdera au recueil du liquide de tympanocentèse, d'expectoration induite, à une ponction-aspiration du sinus maxillaire, à des écouvillonnages (par exemple muqueuse conjonctivale, vagin, urètre, chancre). La colonisation oropharyngée naturelle étant élevée, l'analyse des sécrétions nasales et nasopharyngées n'est pas justifiée. Les rares infections urinaires et les urétrites chroniques peuvent être diagnostiquées à partir de l'urine, à condition d'utiliser un milieu de culture adéquat.

Transport

Les échantillons doivent être acheminés sans délai et à température ambiante au laboratoire compte tenu de l'urgence diagnostique et de la sensibilité des *Haemophilus* à la dessiccation et au froid. Le recours à un milieu de transport gélifié est possible si le délai est supérieur à 3 heures, à température ambiante (la viabilité de *H. ducreyi* est toutefois préservée 3 jours à 4 °C).

Examen direct

L'immobilité et la petite taille des *Haemophilus* rendent l'examen à l'état frais peu utile. La coloration de Gram permet d'observer toutes les espèces, y compris *H. ducreyi* et ses assemblages évocateurs (en banc de poisson, chaîne de bicyclette, ou rails de chemin de fer) à partir de l'écouvillonnage d'une ulcération.

L'interprétation de l'examen direct des produits pathologiques polymicrobiens est souvent difficile, même pour un opérateur entraîné. L'observation de petits coccobacilles à Gram négatif dans un LCR purulent est évocatrice de *H. influenzae*, mais on peut observer des formes longues voire des sphéroplastes sans traitement (Fig. 30.24). La lecture est plus délicate sous traitement et la confusion avec un pneumocoque décoloré est possible. L'encapsulation éventuelle est souvent visible, mais il arrive qu'en dépit de la présence d'un halo autour des bactéries, une souche ne soit pas capsulée, une épaisse couche protéique pouvant recouvrir la membrane externe et produire cet artéfact.

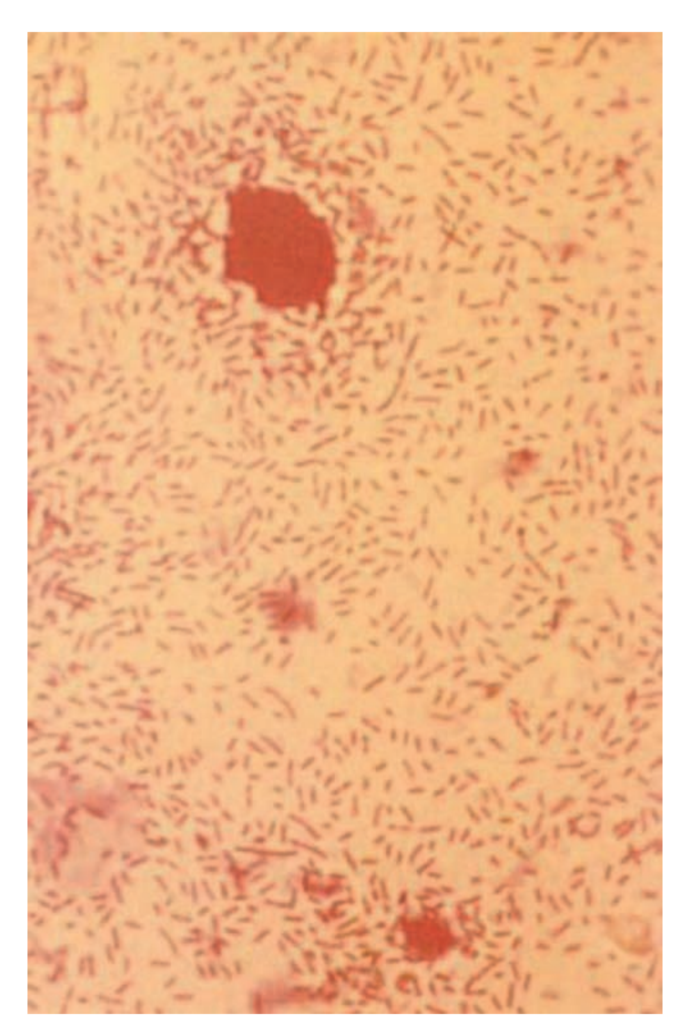


Fig. 30.24 **Examen direct d'un liquide céphalorachidien de méningite à *Haemophilus influenzae*.** Coloration de Gram, ×1000.

Culture

Aucune des espèces d'*Haemophilus* n'est capable de pousser sur gélose ordinaire sans supplémentation par les facteurs X et/ou V.

H. influenzae et *H. haemolyticus* nécessitent une supplémentation en une source d'hème (hémine ou hématine, facteur X) et en bêta-NAD ou NADP (facteur V). Elle est obtenue en routine sur gélose à l'hémoglobine cuite (« chocolat ») supplémentée en polyvitamines (contenant le bêta-NAD), ou sur gélose au sang supplémentée en bêta-NAD (milieu MH-F), l'hème étant apporté dans ce cas par l'hémoglobine de la petite proportion d'hématies lysées au cours de la préparation. Sur gélose au sang non supplémentée, la proximité de colonies d'une espèce productrice de NAD (par exemple *Staphylococcus aureus*) permet une pousse par satellitisme. À l'exception de très rares souches, la pousse d'*H. influenzae* et *H. haemolyticus* ne requiert pas de gaz carbonique. L'isolement à partir des produits pathologiques bénéficie cependant d'une atmosphère enrichie de 5 % de CO_2 et surtout d'une humidité élevée en raison de sa sensibilité à la dessiccation. En 18 à 24 heures à 35 à 37 °C, les colonies sur gélose chocolat (1 à 1,5 mm) sont lisses, légèrement convexes, incolores à chamois, à bord régulier. Les colonies des isolats capsulés sont brillantes et irisées. Un phénotype hypermuqueux est caractéristique des isolats du sérotype e et de certains isolats du sérotype f.

Naturellement résistants aux glycopeptides, lincosamides et à la bacitracine, *H. influenzae* et *H. haemolyticus* peuvent être cultivés à partir d'échantillons polymicrobiens sur des milieux sélectifs contenant un ou plusieurs de ces antibiotiques qui inhibent la plupart des autres bactéries du tractus respiratoire, y compris les *Neisseria* commensales dans le cas de la bacitracine.

Enfin, *H. influenzae* et *H. haemolyticus* sont facilement cultivables à partir du sang en flacon d'hémoculture, la lyse des hématies libérant suffisamment des facteurs X et V pour permettre la pousse. En revanche, l'ensemencement en flacon d'hémoculture d'un liquide non hématique (par

exemple LCR) n'est pas recommandé pour ces deux espèces, en raison de l'absence des deux facteurs.

Les espèces du groupe *parainfluenzae* synthétisent leur propre hème et ne requièrent pas de facteur X. Elles poussent cependant mieux sur gélose chocolat polyvitaminée que sur gélose au sang grâce à l'apport substantiel en bêta-NAD du supplément. L'aspect sur gélose au sang est néanmoins utile à la détection des espèces β-hémolytiques du groupe (*H. parahaemolyticus*, *H. pittmaniae* et *H. sputorum*), en dépit de la taille modeste (0,5 à 1 mm) de leurs colonies. À la différence des *Aggregatibacter*, aucune de ces espèces ne nécessite d'incubation prolongée pour obtenir une pousse visible.

H. ducreyi est une bactérie dont la culture est plus fastidieuse, en raison de sa faible tolérance à l'oxygène et de sa sensibilité à la dessiccation. Elle nécessite l'ensemencement des produits pathologiques sur gélose préparée extemporanément à l'hémoglobine cuite, supplémentée en sérum de veau fœtal (5 %) et rendue sélective par 3 mg/l de vancomycine. L'incubation à 33 à 35 °C en atmosphère microaérobie permet d'obtenir des colonies gris-jaunâtre de 0,5 mm en 2 à 4 jours, qui glissent sur la gélose à la manière d'un palet de hockey.

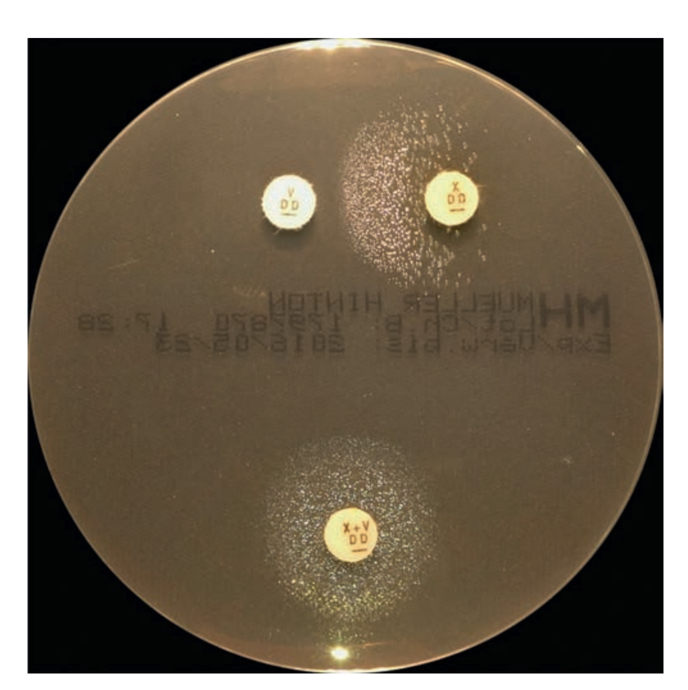


Fig. 30.25 Détermination de l'exigence en facteurs X et/ou V par test de satellitisme. Un inoculum léger en sérum physiologique est ensemencé en nappe sur gélose tryptocaséine-soja ; après séchage, on dispose trois disques imprégnés des facteurs X, V et X+V. Après 18 à 24 heures d'incubation, on observe autour de quel(s) disque(s) apparaissent les colonies. Ici, *H. influenzae*, exigeant les deux facteurs (X et V, en bas), incapable de pousser autour du disque V (en haut à gauche), ni à droite du disque X (en haut à droite). La proximité des disques X et V permet cependant une pousse à l'intersection des zones de diffusion des deux facteurs (en haut).

Éléments d'orientation

Les espèces humaines du genre *Haemophilus* produisent toutes une catalase (à l'exception de *H. ducreyi*) et une oxydase aisément détectables, à condition d'utiliser la tétraméthyl-paraphénylènediamine. La majorité des isolats cliniques de *H. influenzae* (les biotypes I, II, V et VII) produisent de l'indole à partir du tryptophane, conférant une odeur caractéristique aux cultures. Comme toutes les *Pasteurellaceae*, les *Haemophilus* sont naturellement sensibles au composé vibriostatique O129.

Dans le schéma phénotypique traditionnel, l'identification d'espèce se poursuit par la mise en évidence de l'exigence en facteurs X et/ou V pour la croissance sur une gélose dépourvue des deux facteurs (test de satellitisme, Fig. 30.25 et Tableau 30.35).

Une alternative pour démontrer l'incapacité des espèces « X-dépendantes » à synthétiser les porphyrines précurseurs de l'hème consiste à fournir aux bactéries le précurseur de ces porphyrines, l'acide δ-aminolévulinique (dans une gélose, sur des disques de papier imprégné, ou en solution). La synthèse des porphyrines par les bactéries « X-indépendantes » est mise évidence en moins de 6 heures par une fluorescence rouge sous lumière UV ou par coloration violette à l'ajout du réactif de Kovacs. À l'inverse, la réaction est négative (absence de fluorescence ou de coloration) pour *H. influenzae*, *H. haemolyticus* et *H. ducreyi*.

Identification d'espèce

La détermination des caractères métaboliques nécessaires à l'identification de toutes les espèces d'*Haemophilus* est fastidieuse, et malheureusement peu compatible avec les exigences réglementaires de l'accréditation des laboratoires. Les galeries de caractères prédéfinies commercialisées par différentes firmes ont des performances inconstantes, y compris pour identifier *H. influenzae* et *parainfluenzae*, et leur thésaurus d'espèce ne sont pas exhaustifs.

L'identification de toutes les espèces d'*Haemophilus* n'est obtenue en pratique diagnostique que par spectrométrie de masse MALDI-TOF, par comparaison des spectres obtenus à ceux de bases de données de référence, sous réserve de l'exhaustivité de ces dernières. Cette technique permet en particulier de différencier *H. influenzae* des 70 % d'isolats non hémolytiques d'*H. haemolyticus,* autrement indistinguables par les méthodes conventionnelles ou l'analyse des séquences de l'ADN 16S.

La comparaison des séquences de gènes conservés permet d'identifier la plupart des espèces, sans toutefois différencier certaines espèces définies historiquement (*H. influenzae* et *H. aegyptius*, *H. parahaemolyticus* et *H. paraphrohaemolyticus*). Enfin, pour identifier certaines souches proches à la fois d'*H. influenzae* et *H. haemolyticus*, il est nécessaire de recourir à une approche multigénique (*multilocus sequence analysis*).

Typage

Le biotypage d'*H. influenzae* repose sur trois caractères biochimiques, ornithine-décarboxylase, uréase et production d'indole qui définissent 8 biotypes (Tableau 30.36). Les isolats capsulés Hib appartiennent ainsi presque tous aux biotypes I et II. Mais le typage essentiel est celui des souches capsulées. Les 6 sérotypes définis par Margaret Pittman en 1931 (a–f) sont identifiés par agglutination à l'aide de sérums spécifiques, mais la sensibilité inconstante de ceux-ci impose une confirmation génétique par PCR : (1) de la présence d'un gène d'encapsulation (*bexA*), (2) d'un gène spécifique du sérotype (*acs*, *bcs*, *ccs*, *dcs*, *ecs*, *fcs*).

Tableau 30.36 **Caractéristiques des biotypes d'*Haemophilus influenzae*.**

Biotype	Production d'indole	Uréase	Ornithine décarboxylase
I	+	+	+
II	+	+	–
III	–	+	–
IV	–	+	+
V	+	–	+
VI	–	–	+
VII	+	–	–
VIII	–	–	–

La comparaison d'isolats à visée épidémiologique est réalisée principalement par *multilocus sequence typing* (par exemple analyse des séquences concaténées de 7 gènes « domestiques » pour *H. influenzae*, et comparaison en ligne [www.mlst.net]).

Diagnostic direct sur échantillon biologique

La recherche d'antigènes solubles capsulaires b d'*H. influenzae* peut être pratiquée par agglutination latex ou immunochromatographie sur le LCR et le sérum, mais la sensibilité insuffisante et la spécificité moyenne de ces tests imposent une confirmation par une technique moléculaire en cas de positivité.

La détection par PCR dans le LCR d'ADN d'*H. influenzae* et le génosérotypage capsulaire sont devenus essentiels au diagnostic des méningites bactériennes communautaires. Ils peuvent être intégrés à des systèmes de détection de pathogènes multiples bactériens et viraux de type FilmArray™.

La difficulté à cultiver *H. ducreyi* a encouragé la mise au point de techniques de PCR qui permettent aujourd'hui un diagnostic rapide et sensible grâce à une séquence spécifique de l'ARNr 16S ou au gène *groEL*.

Diagnostic indirect

Il n'y a pas de diagnostic sérologique des infections à *H. influenzae*. Le dosage des anticorps anti-Hib n'est utilisé que pour détecter un déficit immunitaire chez un sujet vacciné.

Sensibilité aux antibiotiques

Les espèces du genre *Haemophilus* sont naturellement sensible in vitro aux β-lactamines (hormis les isoxazolylpénicillines et la cefsulodine, et la pénicilline G dans le cas d'*H. parainfluenzae*), aux quinolones, cyclines, rifamycines, sulfamides, triméthoprime, phénicolés, fosfomycine, aminosides, nitrofuranes et même à la mupirocine. Les macrolides et les streptogramines sont également actifs in vitro (CMI : 1–4 mg/l), mais insuffisamment efficaces in vivo pour être utilisés en thérapeutique, à l'exception de l'azithromycine pour *H. ducreyi*. Les résistances naturelles concernent les lincosamides, glycopeptides, nitro-imidazolés et oxazolidinones, l'acide fusidique et la bacitracine.

Les antibiotiques d'intérêt thérapeutique des infections à *Haemophilus* des groupes *influenzae* et *parainfluenzae* sont principalement des β-lactamines (amoxicilline céphalosporines de 3e génération, dont la ceftriaxone, toujours la plus active), les fluoroquinolones, le cotrimoxazole, les tétracyclines et la rifampicine. La sensibilité inconstante aux β-lactamines et au cotrimoxazole (25 % d'isolats résistants) ainsi que l'émergence de souches résistantes aux quinolones rendent l'antibiogramme nécessaire dans la plupart des situations cliniques. Les techniques semi-automatisées étant peu fiables pour détecter les résistances des *Haemophilus*, l'antibiogramme doit être réalisé par la méthode des disques et par epsilométrie (bandelettes imprégnées d'un gradient d'antibiotique) sur milieu gélosé MH-F, selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM). Pour *H. influenzae*, un algorithme simple permet de dépister la résistance aux β-lactamines et aux fluoroquinolones par utilisation d'un disque de pénicilline G (1 UI) et d'un disque d'acide nalidixique (30 μg). En l'absence de diminution d'activité de ces molécules (diamètre d'inhibition autour du disque de pénicilline ≥ 12 mm, autour du disque d'acide nalidixique ≥ 23 mm), les souches sont catégorisées sensibles à toutes les β-lactamines d'intérêt thérapeutique et aux fluoroquinolones, sans qu'il soit nécessaire de mesurer l'activité individuelle. Dans le cas contraire, les CMI des antibiotiques d'intérêt pour le patient doivent être déterminées.

L'activité des β-lactamines peut être diminuée par deux mécanismes, seuls ou combinés :

- environ 15 % des isolats produisent une β-lactamase (TEM-1 ou ROB), inactivant modérément les seules pénicillines (CMI d'amoxicilline, 2–256 mg/l), avec restauration complète de l'activité par adjonction d'acide clavulanique (CMI de co-amoxiclav, 0,125–0,5 mg/l) ;
- environ 15 % de isolats présentent des mutations de la principale protéine liant la pénicilline, la PLP3, réduisant de façon variable et sans restauration par l'acide clavulanique l'activité de l'amoxicilline (CMI, 1–8 mg/l) et/ou des céphalosporines de 3e génération (CMI de ceftriaxone, 0,016–0,5 mg/l). Parmi ces isolats appelés BLNAR (pour *beta-lactamase negative ampicillin resistant*), seuls 5 % sont résistants à l'amoxicilline (CMI ≥ 4 mg/l, CA-SFM 2015). Il est cependant démontré que les isolats BLNAR d'otite moyenne aiguë dont la CMI d'amoxicilline est < 4 mg/l sont souvent responsables de rechutes si l'on utilise cet antibiotique, le co-amoxiclav ou les céphalosporines orales. Enfin, on rencontre maintenant des isolats BLNAR de sensibilité à peine diminuée à l'amoxicilline (CMI, 0,5–1 mg/l), mais résistants au céfotaxime (CMI, 0,25–1 mg/l), voire à la ceftriaxone (CMI, 0,25–0,5 mg/l).

Les deux mécanismes coexistent dans 2 à 5 % des isolats, sans autre conséquence qu'une résistance plus élevée à l'amoxicilline par rapport à un phénotype BLNAR.

Dans le cas (rare) des infections à *H. parainfluenzae*, il convient de mesurer d'emblée les CMI des antibiotiques d'intérêt thérapeutique, les isolats multirésistants (β-lactamines, fluoroquinolones, cyclines, cotrimoxazole et macrolides) ayant émergé en Europe, notamment en contexte d'urétrite aiguë.

Les deux antibiotiques de référence du traitement des infections à *H. ducreyi*, l'azithromycine et la ceftriaxone, sont à ce jour, constamment actifs, alors que la résistance au cotrimoxazole peut atteindre 30 %.

Prophylaxie

La vaccination des nourrissons contre *H. influenzae* b est réalisée avec un vaccin conjugué combiné (Infanrixquenta/Infanrixhexa, Pentavac). Depuis 2013, elle consiste en deux injections aux 2e et 4e mois suivies d'un rappel indispensable entre 11 et 12 mois. Un vaccin monovalent (ActHib) est maintenant disponible. Cette vaccination a montré une remarquable efficacité et entraîné une régression spectaculaire des infections invasives. Les rares échecs sont le plus souvent associés à des vaccinations incomplètes ou à des déficits immunitaires.

La rifampicine est utilisée (10 mg/kg/j en une prise, 4 jours) en chimioprophylaxie des enfants non vaccinés ayant été au contact d'un patient ayant présenté une infection invasive à Hib.

Pour en savoir plus

Kilian M. Haemophilus Winslow, Broadhurst, Buchanan, Rogers and Smith 1917, 561[AL]. In : Kilian M, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed The Proteobacteriaceae. Part B. The Gammaproteobacteria vol. II. New York : Springer ; 2005. p. 883–904.

Ledeboer N, Doern G. Haemophilus. In : Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, et al., editors. Manual of clinical microbiology. 11th ed. Washington DC : ASM Press ; 2015. p. 667–84.

Lewis DA, Mitja O. Haemophilus ducreyi : from sexually transmitted infection to skin ulcer pathogen. Curr Opin Infect Dis 2016 ; 29 : 52–7.

Norskov-Lauritsen N. Classification, identification, and clinical significance of Haemophilus and Aggregatibacter species with host specificity for humans. Clin Microbiol Rev 2014 ; 27 : 214–40.

Adresse utile

Centre national de référence *Haemophilus influenzae*
Dr Olivier Gaillot
Institut de microbiologie, Pôle de biologie-pathologie-génétique
CHU de Lille
Boulevard du Pr Leclercq, 59037 Lille cedex
Tél. : 03 20 44 49 45 – Fax 03 20 44 48 95
E-mail : olivier.gaillot@chru-lille.fr

30.11 Bactéries du groupe HACEK

P. Riegel

Généralités

Les bacilles à Gram négatif présentent des bactéries de bonne croissance comme les entérobactéries, les *Pseudomonas* et apparentés et les espèces du groupe *Vibrio-Aeromonas-Plesiomonas*, mais aussi des bactéries de croissance difficile nécessitant des conditions de culture particulières. Parmi ces dernières, il est décrit un groupe d'espèces dont les caractères communs sont une croissance nulle ou faible sur milieux nutritifs simples, mais nettement plus abondante sur une gélose supplémentée par du sang et/ou par l'addition de CO_2 dans l'atmosphère d'incubation. Ces bactéries sont pour la plupart commensales des muqueuses, notamment celle de la cavité buccale, mais elles peuvent être responsables d'endocardites et d'abcès cérébraux. Il a ainsi été défini un groupe de bactéries de croissance difficile dénommé HACEK qui comprend classiquement les espèces *Aggregatibacter (Haemophilus) aphrophilus*, *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* et *Kingella kingae*. D'autres espèces, notamment des genres *Actinobacillus, Dysgonomonas*, *Haemophilus*, *Kingella*, ou *Neisseria*, présentent ces mêmes caractéristiques. De même, les espèces du genre *Capnocytophaga* pourraient être intégrées dans ce groupe dénommé alors HACCEK. L'utilisation plus fréquente de la biologie moléculaire et l'apparition de nouvelles technologies d'identification comme la spectrométrie de masse MALDI-TOF ont permis depuis quelques années une meilleure reconnaissance de ces bactéries comme agents infectieux (Tableau 30.37).

Il existe également des bacilles à Gram négatif de l'environnement des genres *Chromobacterium*, *Methylobacterium* et *Paracoccus* qui présentent des croissances lentes et exigeantes. Bien que certaines de ces bactéries soient aérobies strictes, elles constituent toutes un diagnostic différentiel avec les bactéries du groupe HACEK.

Il ne faut pas oublier que toute bactérie peut voir son métabolisme modifié dans certaines conditions (présence d'antibiotiques, infections chroniques, etc.) et se révéler alors de culture exigeante.

Tableau 30.37 **Position du groupe HACEK parmi les principaux bacilles à Gram négatif.**

Exigence particulière de croissance	Fermentation	Principaux genres bactériens
Aucune	+	*Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pasteurella*, entérobactéries
	–	*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas Acinetobacter*, *Moraxella*,
Addition de sang ± CO_2	+	Groupe HACEK, *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Kingella*, *Streptobacillus*, *Chromobacterium*, *Haemophilus* (exigence en facteur V et/ou X)
	–	*Brucella*, *Neisseria* (espèces bacillaires), *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Francisella*
Milieux et/ou conditions spécifiques	–	*Campylobacter*, *Helicobacter*, *Bordetella pertussis*, *Legionella*

Bactéries fastidious – *points à retenir*

- Toute bactérie peut devenir *fastidious*
- Comprend le groupe HACEK mais aussi d'autres espèces
- Origine : saprophytes des muqueuses humaines et/ou animales (morsure)
- Ne pas négliger la possibilité de *Brucella*, *Francisella* ou *Streptobacillus*
- Quelques espèces de l'environnement
- Gram parfois variable

Taxonomie

Les espèces *Haemophilus aphrophilus* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ont été transférées en 2006 dans un nouveau genre *Aggregatibacter* inclus dans la famille des *Pasteurellaceae*. En même temps, l'espèce *Haemophilus paraphrophilus* est devenue un synonyme d'*A. aphrophilus* avec antériorité pour cette dernière espèce qui comprend donc des souches dépendantes et des souches indépendantes en facteur V pour leur croissance, toutes les souches étant indépendantes en facteur X.

Cardiobacterium hominis est l'espèce type du genre *Cardiobacterium*, et constitue l'ancien groupe IId du Centers for Disease Control and Prevention (CDC), proche de *Suttonella indologenes* (*Cardiobacteriaceae*). Une deuxième espèce *C. valvarum* a été décrite en 2004. Le genre *Eikenella* ne comprend qu'une seule espèce : *E. corrodens* (anciennement groupe HB-1 du CDC). *Kingella kingae* (ancien groupe M1 du CDC) est une des quatre espèces du genre *Kingella* qui appartient à la famille des *Neisseriaceae*.

Culture

Les bactéries du groupe HACEK ont une croissance anaérobie facultative, mais sont plus exigeantes que les espèces des familles *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* et *Aeromonadaceae*. Leur croissance est très faible ou nulle sur milieu gélosé simple et la plupart d'entre elles ne poussent pas sur milieu sélectif pour bactéries à Gram négatif (Fig. 30.26). Elles ont besoin de facteurs nutritifs qui peuvent être apportés par le sang, notamment le sang cuit contenu dans les géloses dites « chocolat » en plus de facteurs de croissance supplémentaires. Leur croissance est souvent améliorée ou même obligatoire (bactéries capnophiles, Fig. 30.27) par l'addition de 5 à 10 % de CO_2 dans l'atmosphère ambiante d'incubation. Elles ne sont pas mobiles en raison de l'absence de flagelles. Leur isolement à partir de prélèvements cliniques prend souvent plus de 24 heures, ce qui justifie de laisser incuber les géloses « chocolat » au minimum 4 jours. Les flacons d'hémocultures sont classiquement incubés plus de 2 semaines en cas de suspicion d'endocardites à groupe HACEK, mais les automates récents détecteraient ces bactéries en moins de 5 jours.

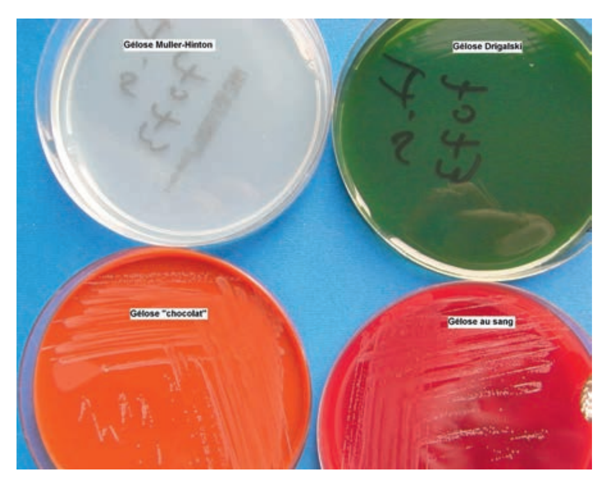


Fig. 30.26 Croissance d'*Haemophilus aphrophilus* sur différents milieux.

Identification

Le principal problème soulevé par l'identification de ces bactéries tient à la possibilité de donner des tests biochimiques faussement négatifs. L'identification présomptive de ces bactéries est fondée sur l'aspect des colonies sur différents milieux et sous différentes atmosphères, la morphologie à la coloration de Gram et à quelques tests biochimiques simples : catalase, oxydase, et production d'indole (Tableau 30.38).

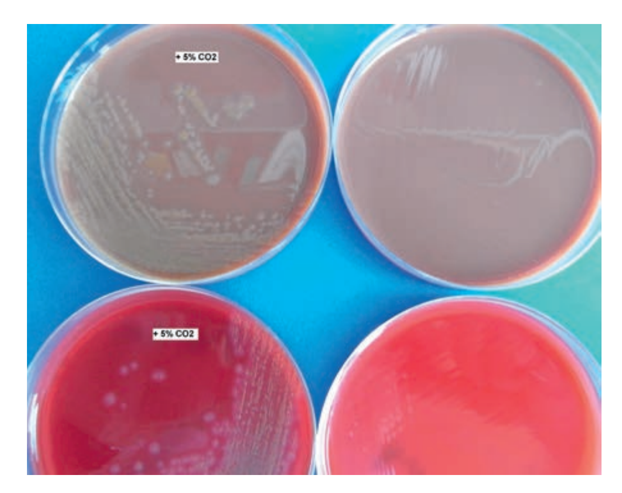


Fig. 30.27 Croissance capnophile de *Capnocytophaga gingivalis*.

Tableau 30.38 Tests phénotypiques d'orientation du groupe HACEK.

– Type respiratoire, incuber en différentes atmosphères à 37 °C
- Atmosphère ambiante
- Atmosphère ambiante avec 10 % de CO_2 (bactéries capnophiles)
- Anaérobiose

– Tests biochimiques d'orientation
- Oxydase : éviter la gélose « chocolat » (faux négatifs)
- Catalase : éviter de prendre de la gélose ou bien en milieu liquide

– Indole : milieu urée-indole ou spot test

Identification différentielle

Le tableau 30.39 montre les caractères phénotypiques permettant un diagnostic présomptif des espèces au sein du groupe HACEK et des bactéries apparentées proches. Il est nécessaire de regarder attentivement ces cultures parfois sous une loupe binoculaire, et d'évaluer le caractère adhérent ou creusant la gélose (*pitting*). En cas de doute sur la nature du Gram, on peut devoir rechercher une alanine aminopeptidase (positive pour les Gram négatif). Certaines de ces bactéries présentent une relative sensibilité à la vancomycine (*Cardiobacterium hominis*, *Kingella kingae*) pouvant faire douter de la nature Gram négatif de ces bactéries.

La carte Vitek NH® (bioMérieux) permet une bonne identification des espèces du groupe HACEK. La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une technique performante pour identifier ces bactéries, bien que les scores d'identification obtenus soient souvent inférieurs à ceux que l'on obtient habituellement pour les bactéries de bonne croissance. Cela peut nécessiter une extraction protéique préalable. L'espèce *A. aphrophilus* semble la moins bien identifiée par cette technologie.

Dans le cas d'infections sévères (endocardites notamment), l'identification par séquençage de gènes doit être entreprise en cas d'identifications phénotypiques non concluantes

Antibiogramme

La réalisation de cet antibiogramme se heurte à des problèmes tenant à la croissance lente et à l'absence de standardisation de la technique à utiliser. Il n'existe pas de valeurs critiques spécifiques permettant l'interprétation des résultats obtenus par la méthode de diffusion en milieu gélosé ou par la détermination des CMI en milieu liquide ou gélosé. En pratique, on utilise la technique par diffusion à partir de disque effectuée sur gélose au sang ou au sang cuit incubée à 37 °C en aérobiose.

Une recherche de production de pénicillinase par le test à la céfinase doit toujours accompagner l'antibiogramme de ces bactéries.

Description des bactéries du groupe HACEK

L'orientation vers une de ces bactéries se fait à l'aide des caractères exposés dans les tableaux 30.37 et 30.39. L'identification de l'espèce peut être effectuée avec un petit nombre de caractères simples inclus dans le tableau 30.40.

Aggregatibacter spp.

Ce genre bactérien de description récente comprend les espèces *A. actinomycetemcomitans* et *A. aphrophilus* (anciennement *Haemophilus aphrophilus*) qui constituent en partie le groupe HACEK, ainsi qu'*A. segnis*.

Habitat et pouvoir pathogène

A. actinomycetemcomitans est une bactérie strictement humaine retrouvée sur la muqueuse buccale. Elle est responsable d'endocardites, d'abcès cérébraux et de lésions périodontales. Elle peut être isolée en association avec une bactérie du genre *Actinomyces* dans le cas d'une actinomycose. *A. aphrophilus* est saprophyte de la cavité orale et des voies aériennes supérieures de l'homme et peut aussi être responsable d'endocardites sur valves lésées ou prothétiques et d'abcès cérébraux. Dans près de la moitié des cas, une intervention dentaire a précédé ces infections sévères. Cette espèce a aussi été isolée de prélèvements osseux, articulaires et de lésions oculaires (endophtalmie, canaliculite) ainsi que chez le chien. L'espèce *A. segnis* semble avoir le même habitat et la même pathogénicité que les autres espèces de ce genre.

Caractères bactériologiques

Ce sont des petits bacilles à Gram négatif, à croissance aéro-anaérobie facultative relativement lente. Il n'y a pas de réelle dépendance en facteur X, mais certaines souches demandent ce facteur de croissance à la primoculture. La dépendance en facteur V est variable (souches correspondant à l'ancienne espèce *H. paraphrophilus* et certaines souches d'*A. segnis*). Les colonies sont blanches ou grisâtres et non hémolytiques.

Tableau 30.39 **Principaux caractères différentiels du groupe HACEK et apparentés.**

	Catalase	Oxydase	Caractères culturaux	Morphologie
Aggregatibacter aphrophilus	–	(–)	± exigence en facteur V	Petits bacilles
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	+	(–)	Colonies adhérentes, aspect étoilé	Coccobacilles
Cardiobacterium hominis	–	+	Colonies grises, convexes, brillantes	Bacilles droits parfois en rosette Gram irrégulier
Kingella spp.	–	+	Légère β-hémolyse	Bacilles courts, courtes chaînettes, peu décolorable
Eikenella corrodens	–	+	Colonies creusant la gélose, odeur d'eau de Javel	Bacilles droits, assez fins
Neisseria animaloris	+	+	Colonies jaunâtres à odeur de pop-corn	Bacilles courts
Capnocytophaga DF-1 (espèces humaines)	–	–	Colonies plates à bords frangés	Longs bacilles effilés
Capnocytophaga DF-2 (espèces animales)	+	+	Colonies plates et irrégulières	Longs bacilles effilés

Tableau 30.40 **Identification des bactéries du groupe HACEK et apparentés.**

Catalase	Oxydase	Production d'indole	Réduction des nitrates	Hydrolyse de l'esculine	Identification	Caractères différentiels
+	+	+	+		*Pasteurella* spp.	
		−	+	−	*Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Actinobacillus ureae*	*A. ureae* : uréase +
					Neisseria animaloris, Neisseria zoodegmatis	Maltose −, uréase −
				V	*Actinobacillus hominis*	Maltose +, uréase +
			−	V	*Capnocytophaga canimorsus, C. cynodegmi*	Aéro-anaérobie facultatif
					Neisseria weaveri, Neisseria elongata subsp. *glycolytica*	Aérobie strict
	−	+	−	+	*Dysgonomonas gadei*	
		−	+	−	*Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Actinobacilus ureae*	*A. ureae* : uréase +
−	+	+	+	−	*Pasteurella bettyae*	
			−	−	*Cardiobacterium hominis, Cardiobacterium valvarum*	*C. hominis* : Saccharose +
		−	+	−	*Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens*	Aérobie strict
					Kingella denitrificans	ODC −, maltose −
					Aggregatibacter aphrophilus, A. paraphrophilus	ODC −, maltose +
					Eikenella corrodens	ODC +,
			−	−	*Kingella kingae*	β-hémol +, Maltose +
				−	*Cardiobacterium valvarum*	Maltose V
					Neisseria elongata subsp. *elongata*	Maltose −
	−	+	+	−	*Pasteurella bettyae*	
			−	V	*Dysgonomonas capnocytophagoides, D. hofstadii*	*D. hofstadii* : β-glucuronidase −
		−	+	+	*Capnocytophaga haemolytica, Capnocytophaga sputigena*	
				−	*Aggregatibacter aphrophilus*	
			−	V	*Capnocytophaga* spp. (*C. ochracea, C. sputigena, C. gingivalis, C. granulosa*)	
				−	*Dysgonomonas capnocytophagoides, Dysgonomonas mossii*	

A. actinomycetemcomitans présente des colonies légèrement adhérentes à la gélose en forme d'étoile à centre opaque, ces colonies pouvant être sous forme *rough*. L'oxydase est négative ou très faible. *A. actinomycetemcomitans* est différenciée d'*A. aphrophilus* par la présence d'une catalase et l'absence de β-galactosidase, et différenciée d'*A. segnis* par une fermentation du mannose (la catalase et la β-galactosidase étant variables pour cette espèce). *A. aphrophilus* présente une fermentation du lactose et du mannose contrairement à *A. segnis*. *A. segnis* est difficilement différenciable de *Haemophilus parainfluenzae* biotype V (négatif pour les réactions de l'indole et de l'ornithine décarboxylase).

Sensibilité aux antibiotiques

On utilise la gélose au sang cuit. *A. actinomycetemcomitans* présente une sensibilité modérée vis-à-vis des β-lactamines (CMI : 0,25–4 mg/l pour l'amoxicilline), mais très bonne pour les céphalosporines de 3e génération (CMI : 0,03–0,06 mg/l pour le céfotaxime). L'activité des autres antibiotiques est variable, sauf pour les lincosamines constamment inefficaces. *A. aphrophilus* est habituellement bien sensible aux antibiotiques, les macrolides et les aminosides étant les moins efficaces. Ces espèces ne produiraient pas de pénicillinase.

Cardiobacterium hominis

Le genre *Cardiobacterium* contient deux espèces : *C. hominis* et *C. valvarum*.

Habitat et pouvoir pathogène

L'habitat normal de *C. hominis* est le tractus respiratoire supérieur, mais cette espèce peut être retrouvée dans des échantillons génito-urinaires. Elle est responsable d'endocardites à

point de départ oral ou digestif, notamment après colonoscopie. *C. valvarum* a été isolé de valve cardiaque de quelques cas d'endocardites. Sa participation aux infections périodontales reste à être évaluée.

Caractères bactériologiques

Ce sont des bactéries à Gram négatif mais dont les extrémités peuvent paraître à Gram positif. Il s'agit de bacilles droits, immobiles, se groupant en courtes chaînes ou en rosettes.

Leur croissance nécessite des milieux contenant du sang et elle est favorisée par une atmosphère contenant 5 à 10 % de CO_2. Les colonies sont rondes, convexes, opaques et creusent légèrement la gélose. Il peut exister une légère hémolyse α. Les deux espèces sont oxydase positive et les tests catalase, uréase et nitrate-réductase sont négatifs. La différenciation entre les deux espèces semble difficile, *C. hominis* fermentant le mannitol alors que cette propriété est rare pour *C. valvarum*.

Sensibilité aux antibiotiques

Les deux espèces sont sensibles à la plupart des antibiotiques, sauf les lincosamines et les glycopeptides, bien que des souches puissent présenter des CMI inférieures à 4 mg/l. Une production de pénicillinase est possible. Une résistance aux aminosides et au cotrimoxazole a été décelée chez quelques souches.

Eikenella corrodens

Habitat et pouvoir pathogène

E. corrodens est une espèce saprophyte de la cavité orale de l'homme et de certains animaux (singe, chat et chien). On peut aussi retrouver cette espèce dans la flore digestive et génitale. La majorité des infections sont localisées au niveau de la tête et du cou (abcès cérébraux, abcès thyroïdiens, sinusites, ethmoïdite, infections oculaires), mais on peut aussi l'isoler de prélèvements respiratoires, d'ascites, d'abcès digestif ou rénaux. Dans la majorité des cas, on l'isole en association avec d'autres bactéries, en particulier des anaérobies et des streptocoques. *E. corrodens* fait partie des causes peu fréquentes d'endocardites, parfois avec hémocultures négatives. Il faut aussi noter sa présence dans environ 8 % des cas de surinfections de plaies après morsure humaine contre 0,5 % pour les morsures de chat ou de chien. Cette espèce jouerait un rôle dans certaines périodonties de l'enfant et de l'adulte jeune, toujours en association avec d'autres bactéries.

Caractères bactériologiques

Ce sont des bacilles à Gram négatif, fins, droit, immobiles.

La croissance aérobie-anaérobie facultative est assez lente (2 à 3 jours), sur des milieux contenant du sang. Il n'y a pas de culture sur milieu non enrichi ou MacConkey.

Les colonies sont grisâtres, difficiles à prélever, avec un centre plus clair entouré d'une zone perlée. Elles sont non hémolytiques mais on relève la présence d'un halo de verdissement sur gélose au sang. Après 4 à 5 jours de cultures, on observe un creusement de la gélose et une coloration jaunâtre (Fig. 30.28). La culture à une odeur d'eau de Javel.

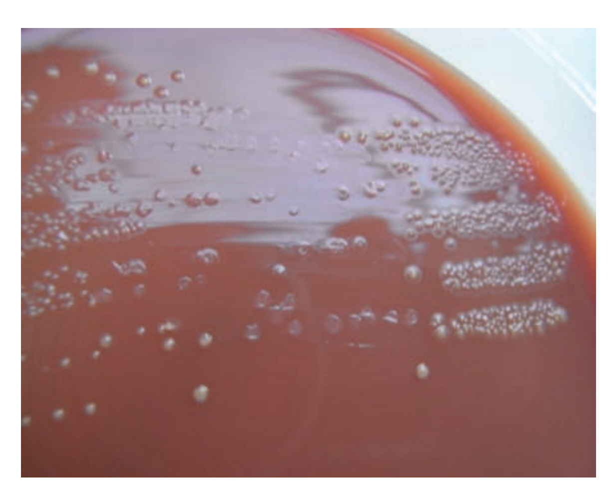


Fig. 30.28 Colonies incrustées d'*Eikenella corrodens*.

Ces bacilles sont oxydase +, catalase –, cette espèce n'utilisant pas le glucose, ce qui en fait un caractère différentiel avec les autres bactéries du groupe HACEK.

Sensibilité aux antibiotiques

E. corrodens est modérément sensible aux pénicillines (CMI 50 pénicilline = 2 mg/l et CMI 50 amoxicilline = 0,50 mg/l), mais bien sensible aux céphalosporines de 3e génération (CMI 50 céfotaxime = 0,125 mg/l). La présence de β-lactamase doit être recherchée.

E. corrodens est résistant à la clindamycine et au métronidazole, et de sensibilité variable aux macrolides et aux aminosides.

Kingella spp.

Habitat et pouvoir pathogène

Ce genre contient 4 espèces (*K. denitrificans*, *K. kingae*, *K. oralis* et *K. potus*). Ces espèces peuvent être isolées à partir d'échantillons humains. *K. kingae*, *K. oralis* et *K. denitrificans* sont des saprophytes de la sphère ORL alors que *K. potus* a été isolée d'une plaie infectée suite à une morsure animale. *K. kingae* semble fréquente chez l'enfant (75 % des enfants de plus de 6 mois sont porteurs de cette bactérie au niveau pharyngé) en étant responsable d'infections ostéoarticulaires (ostéomyélites, arthrites septiques touchant une seule articulation, spondylodiscites) suite souvent à une infection ORL d'origine virale. Ces infections sont caractérisées par un syndrome inflammatoire modéré. De rares cas de méningites et d'infections oculaires ont été décrits chez l'enfant. Chez l'adulte, *K. kingae* est surtout responsable d'endocardites, mais aussi d'infections ostéoarticulaires et oculaires. *K. denitrificans* a également été isolée de patients souffrant d'endocardite, alors que *K. oralis* n'a été isolée que de prélèvements buccaux.

Caractère bactériologiques

Ce sont des bacilles à Gram négatif mais difficilement décolorables, assez courts, pouvant se mettre en courte chaînette (Fig. 30.29). Ces espèces possèdent une oxydase mais pas de catalase et la réaction de l'indole est négative. *K. kingae* présente une β-hémolyse étroite sur gélose au sang. *K. denitrificans* possède une nitrate-réductase mais pas de phosphatase alcaline, au

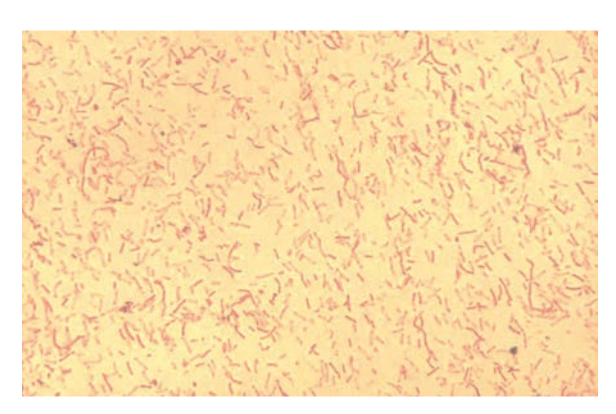


Fig.30.29 Coloration de Gram de *Kingella kingae*.

contraire de *K. kingae* et de *K. oralis*. L'espèce *K. potus* ne possède pas les activités phosphatase alcaline et nitrate-réductase.

Sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme se fait sur gélose Mueller-Hinton enrichie en sang ou gélose au sang cuit. *K. kingae* est habituellement bien sensible aux antibiotiques, à l'exception des lincosamines et des glycopeptides. Il y a la possibilité d'une pénicillinase, et de résistances touchant le cotrimoxazole, la ciprofloxacine ou l'érythromycine. L'unique souche de *Kingella potus* est sensible aux β-lactamines et à la ciprofloxacine, mais résistante à l'érythromycine, à la clindamycine et à la gentamicine.

- *Kingella kingae* est la première cause d'infections ostéoarticulaires chez le jeune enfant.
- Elle cultive mieux en flacons d'hémocultures.
- Une PCR universelle ou, mieux, spécifique permet de détecter plus de la moitié des infections à *K. kingae* à culture négative.
- *K. kingae* est β-hémolytique.

Bactéries apparentées

Capnocytophaga spp.

Ce genre contient plusieurs espèces qui peuvent être séparées en deux groupes. Les espèces *C. ochracea* (ancien groupe DF-1), *C. gingivalis*, *C. sputigena*, *C. haemolytica*, *C. leadbetteri* et *C. granulosa* sont oxydase et catalase négatives et sont des saprophytes de la cavité buccale de l'homme. Les espèces *C. canimorsus* (ancien groupe DF-2) et *C. cynodegmi* sont oxydase et catalase positives, et sont des saprophytes de la gueule du chien et du chat. Les bactéries saprophytes de l'homme sont principalement isolées d'infections ORL et peuvent être responsables d'endocardites chez les patients immunodéprimés présentant souvent une ulcération buccale. Les bactéries provenant des animaux, notamment *C. canimorsus*, sont isolées de plaies infectées après morsures ou griffures, pouvant se compliquer surtout chez le patient splénectomisé ou éthylique chronique d'une dermohypodermite avec septicémie et de localisations secondaires principalement méningées. Il s'agit de bacilles à Gram négatif longs et fins (Fig. 30.30). Les colonies sur milieux enrichis au sang sont souvent étalées, à bords irréguliers, dentelées ou perlées, surtout pour les espèces d'origine humaine (Fig. 30.31). Ces

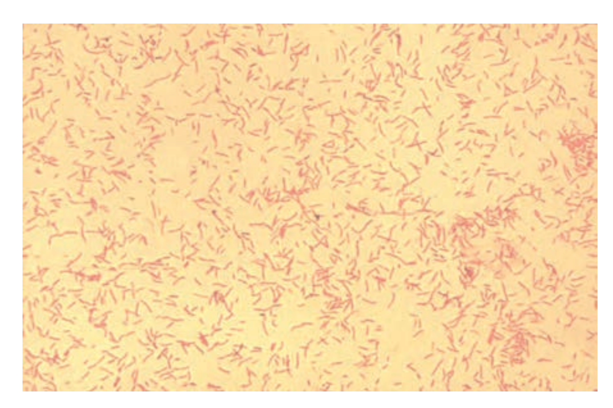


Fig. 30.30 Coloration de Gram de *Capnocytophaga canimorsus*.

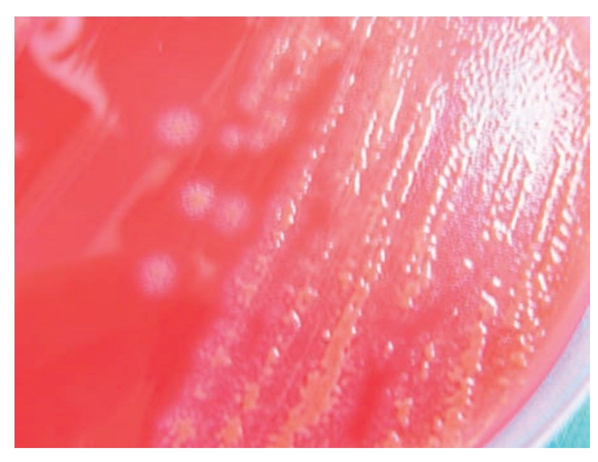


Fig. 30.31 Colonies de *Capnocytophaga gingivalis*.

bacilles sont habituellement sensibles aux antibiotiques, sauf aux aminosides, mais la présence d'une pénicillinase est possible. Des souches exprimant une BLSE ont été décrites.

Neisseria spp. atypiques

Les espèces *N. animaloris* (ancien groupe EF-4a), *N. weaveri* (ancien groupe M-5) et *N. zoodegmatis* (ancien groupe EF-4b) se présentent comme des coccobacilles ou bacilles à Gram négatif courts qui semblent appartenir à la flore normale de la gueule de certains animaux. On les retrouve donc à partir de plaies infectées après morsures animales. Les espèces *N. elongata* et *N. bacilliformis* montrent aussi des formes bacillaires, mais sont isolées habituellement de l'homme. L'oxydase est positive. La catalase est positive pour *N. animaloris*, *N. weaveri* et *N. zoodegmatis*, mais variable pour *N. elongata* et *N. bacilliformis*. Ils sont sensibles à la plupart des antibiotiques, sauf aux aminosides pour certaines souches et aux lincosamines.

Dysgonomonas spp.

Ce genre contient sept espèces mais seulement trois sont d'importance en clinique humaine : *D. capnocytophagoides* (ancien groupe DF-3), *D. gadei* et *D. mossii*. Ces espèces ont été isolées de selles (*D. capnocytophagoides*), d'un calcul urinaire (*D. gadei*) et de divers prélèvements humains pour *D. mossii*. Ce sont des bacilles courts à Gram négatif qui forment des colonies convexes, gris pâle, non hémolytiques à odeur fruitée. Ces espèces sont oxydase négative. *D. gadei* est catalase

positive à l'inverse des deux autres espèces. *D. mossii* peut être différencié de *D. capnocytophagoides* par la production de β-N-acétyl-glucosaminidase. Ces bactéries sont peu sensibles aux aminosides, macrolides et β-lactamines, sauf aux associations avec un inhibiteur de β-lactamase et à l'imipénème, mais sensibles aux tétracyclines, rifampicine et cotrimoxazole.

Actinobacillus

Ce genre appartient à la famille des *Pasteurellaceae* et comprend des espèces humaines (*A. hominis* et *A. ureae*) ou animales. Ces dernières peuvent être pathogènes, comme *A. lignieresii*, causant des abcès granulomateux chez le mouton, et peuvent être isolées chez l'homme suite à un contact avec un animal, notamment par morsure. L'habitat des espèces humaines semble être l'oropharynx, mais leur pathologie n'est pas établie. Les *Actinobacillus* sont des bacilles ou des coccobacilles à Gram négatif, isolés ou en courte chaînettes, immobiles. Les colonies, non pigmentées, sont adhérentes à la gélose et parfois visqueuses. Certaines espèces animales ont une activité β-hémolytique. Le genre *Actinobacillus* possède une nitrate réductase et est le plus souvent oxydase et uréase positives. La catalase est variable. Cette espèce est bien sensible aux antibiotiques.

Chromobacterium

Le genre *Chromobacterium* contient des bacilles mobiles de type anaérobie facultatif, mais dont l'habitat est l'environnement. Il produit le plus souvent un pigment rendant les colonies violettes. L'espèce *C. violaceum* est responsable d'infections de plaies souillées qui peuvent se compliquer de septicémies, notamment chez des patients présentant un déficit génétique de la fonction granulocytaire. Cette espèce est résistante à la majorité des β-lactamines, mais reste sensible à l'imipenème, aux tétracyclines et aux fluoroquinolones.

Streptobacillus moniliformis

Cette espèce présente des bacilles longs et effilés qui peuvent facilement produire des formes en L donnant alors un aspect de « cordes à nœuds » (Fig. 30.32). Elle est résidente des rongeurs et peut contaminer l'homme par morsure en donnant une fièvre soit isolée, soit compliquée par une polyarthrite et des éruptions maculopapuleuses de la main. Paradoxalement, elle ne pousse pas sur gélose au sang cuit mais sur gélose au sang. Elle est sensible aux pénicillines qui sont la base du traitement en association avec un aminoside.

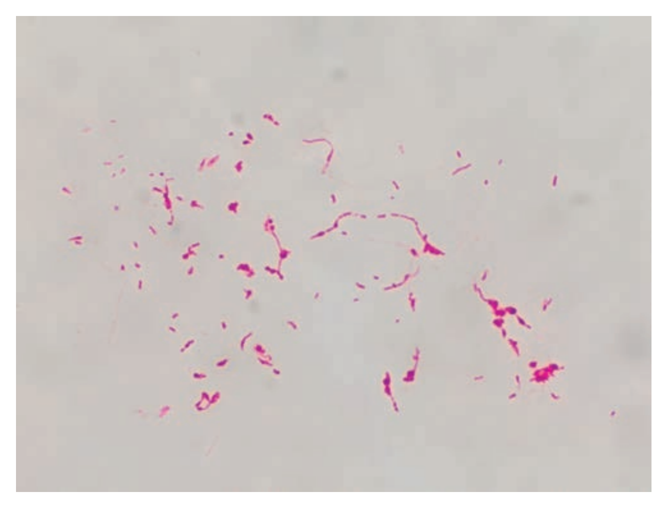


Fig. 30.32 Coloration de Gram de *Streptobacillus moniliformis*.

Pour en savoir plus

Riegel P, Archambaud M, Clavé D, Vergnaud M. Bactéries de culture et d'identification difficiles. BioMérieux ; 2006.

Vergnaud M. Bacilles à Gram négatif inhabituels. In : Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2007. p. 1445–57.

Vergnaud M. HACEK et dysgonic fermenters. In : Antibiogramme. Paris : ESKA ; 2012. p. 611–21.

Zbinden R. *Aggregatibacter*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Kingella*, *Pasteurella*, and other fastidious or rarely encountered Gram-negative rods. In : Jorgensen JH, et al., editors. Manual of clinical microbiology. 11th ed. Washington : ASM Press ; 2015. p. 621–35.

30.12 *Bartonella* : agent de la maladie des griffes du chat et genres apparentés

F. Denis, C. Martin

Généralités

Ces bactéries sont classées parmi les protéobactéries du groupe α2 sur la base de la séquence de l'ARN 16S ribosomal. Dans ce groupe, on trouve parmi les bactéries pathogènes pour l'homme les genres *Afipia*, *Brucella* et *Bartonella*. Le genre *Bartonella* regroupe actuellement plus de 15 espèces.

Bartonella bacilliformis est responsable de la maladie de Carrion ou fièvre d'Oroya, anémie hémolytique souvent mortelle et d'une forme cutanée moins sévère, la verruga peruana. Ces affections sévissent au Pérou et en Colombie.

B. quintana est responsable de la fièvre des tranchées.

B. henselae est impliquée dans la maladie des griffes du chat.

Ce sont de petits bacilles à Gram négatif difficiles à mettre en évidence au Gram, auquel on préfère la coloration de Gimenez.

Habitat, maladie

Après contact et le plus souvent après morsure ou griffure de chat, on peut observer la « maladie des griffes du chat ». Il s'agit d'une infection bénigne caractérisée par une pustule ou une papule au site d'inoculation, survenant 4 à 6 jours après griffure ou morsure, rapidement suivie d'une adénopathie associée ou non à d'autres manifestations telles que fièvre, fatigue, malaise, splénomégalie. La lésion ganglionnaire est

très rarement suppurative et les complications sont rares. L'examen anatomopathologique des ganglions permet de distinguer trois stades.

Les agents étiologiques et leur classification ont donné lieu à des polémiques. On reconnaît à ce jour deux agents étiologiques :

- *Afipia felis* a été isolé à plusieurs reprises à partir de ganglions de patients présentant une maladie des griffes du chat, mais les sérologies sont rarement positives. D'autres espèces d'*Afipia* ont été décrites; leur réservoir hydrique probable les fait suspecter dans des infections respiratoires, notamment nosocomiales;
- *Bartonella henselae* (ex-*Rochalimaea henselae*) serait l'agent étiologique le plus fréquent de la maladie des griffes du chat avec *B. clarridgeiae*. Cette espèce est par ailleurs impliquée dans l'angiomatose bacillaire (forme généralisée et survenant chez des patients immunodéprimés). *B. henselae* peut aussi être retrouvée dans la péliose hépatique, des septicémies, des endocardites voire dans des atteintes neurologiques.

B. henselae est l'étiologie la plus fréquente du syndrome oculoglandulaire de Parinaud.

Diagnostic direct

Prélèvement

Il s'agit le plus souvent de prélèvements (biopsies de ganglions, foie, peau, moelle osseuse) de patients présentant une maladie des griffes du chat, voire par hémoculture. Le sang peut être prélevé par le système Isolator® de centrifugation-lyse avant de procéder à la mise en culture du culot.

Culture

A. felis cultive habituellement sur gélose BCYE (*buffered charcoal yeast extract*) ou gélose au sang frais en atmosphère ordinaire placé à 25 à 30 °C. Après une incubation de 10 à 15 jours en primoculture (3 jours en sous-culture), on note l'apparition de petites colonies (0,5 à 1,5 µm) grisâtres, opaques et convexes.

L'inoculation de lignées cellulaires, cellules Hela ou cellules endothéliales humaines (HMEC-1), permet également l'isolement.

À partir des colonies, on peut visualiser sur frottis *A. felis* grâce à la coloration de Gimenez révélant des bacilles de petite taille (0,2 à 0,5 µm × 0,2 à 0,5 µm) ou par immunofluorescence directe.

La bactérie est mobile par ciliature polaire, oxydase positive, catalase négative, uréase positive, réduisant les nitrates en nitrites mais n'attaquant pas le glucose, le lactose, le maltose, le sucrose, l'esculine, et elle ne produit pas d'indole. À côté d'*A. felis*, ont été décrits différentes espèces (*A. clevelaudensis*, *A. massiliensis*, etc.) et différents *genospecies*.

Aucun chat n'a été trouvé porteur d'*A. felis*, ce qui rend peu vraisemblable le rôle joué par cette bactérie dans la maladie des griffes du chat.

B. henselae est un bacille à Gram négatif de 0,5 à 0,6 µm × 1,0 à 2,0 µm légèrement incurvé et immobile. Cette espèce aérobie a également une croissance longue et difficile; elle

Tableau 30.41 Les différentes approches dans le diagnostic des infections à *Bartonella*.

Entité clinique	PCR	Culture		Anatomopathologie	Sérologie
		Tissus	Sang		
Maladies des griffes du chat	++[a]	±	–	+++[a]	+++
Angiomatose bacillaire	+++[b]	++[b]	+++	++[b]	±
Endocardite	+[c]	++[c]	++	–	+++

[a] Ganglion; [b] Lésions cutanées; [c] Valve cardiaque.
(D'après Guillaume Arlet, www.microbes-edu.org/etudiant/bartonella/bartonella.html.)

nécessite de l'hémine et une atmosphère enrichie en CO_2. La température optimale de croissance est 37 °C.

La culture se fait sur gélose au sang cuit cœur-cervelle supplémentée de 5 % de sang.

La culture nécessite plus de 15 jours d'incubation, voire jusqu'à 4 semaines. Les délais de culture se raccourcissent lors des repiquages (3 à 5 jours).

Les colonies sont petites (< 1 mm), blanches et sèches; elles s'enfoncent dans la gélose.

B. henselae apparaît oxydase, catalase, uréase et indole négatifs, et présente une faible activité métabolique.

Sensibilité aux antibiotiques

A. felis est une espèce très résistante aux antibiotiques. Seuls l'imipénem et les aminosides sont actifs in vitro. De plus, les membres de cette famille seraient bactéricides en intracellulaire. En revanche, *B. henselae* est très sensible aux antibiotiques : β-lactamines (notamment ceftriaxone), aminosides, rifampicine, cyclines, macrolides, ciprofloxacine.

Diagnostic moléculaire d'*A. felis* et de *B. henselae*

La recherche d'ADN et d'ARN 16S dans des échantillons ganglionnaires a été un échec pour *A. felis,* alors que l'ADN *Bartonella* spp. (gène de la citrate synthétase ou sous-unité 16S de l'ARN ribosomal) a été retrouvé respectivement dans 96 et 60 % des cas certains et des cas probables de maladie des griffes du chat.

Une PCR permet un diagnostic rapide sur tissus (ganglion, peau, valve, etc.) (Tableau 30.41).

Diagnostic indirect : sérodiagnostic

Des techniques d'immunofluorescence indirecte ont montré une fréquente positivité des sérums des patients présentant une maladie des griffes du chat pour *B. henselae* (88 %) et des résultats rarement positifs pour *A. felis* (5 %). Des taux d'IgG ≥ 1:100 en immunofluorescence indirecte (IFI) sont significatifs pour la maladie des griffes du chat et ≥ 1:800 pour une endocardite. Des techniques ELISA sont en cours d'évaluation; la sensibilité de l'ELISA serait légèrement supérieure à l'IFI.

Pour en savoir plus

Anderson BE, Neuman MA. Bartonella spp. as emerging human pathogens. Clin Microbiol Rev 1997 ; 10 : 203–19.

Bergmans AMC, Groothedde JW, Schellekens JFP, et al. Etiology of cat scratch disease : comparison of polymerase chain reaction detection of Bartonella (formerly Rochalimaea) and Afipia felis DNA with serology and skin tests. J Infect Dis 1995 ; 171 : 916–23.

Brenner DJ. Proposal of Afipia gen. nov., with Afipia felis spp. nov. (formerly the cat scratch disease bacillus), Afipia clevelandensis spp. nov. (formerly the Cleveland Clinic Foundation strain), Afipia broomae sp. nov. and three unnamed genospecies. J Clin Microbiol 1991 ; 29 : 2450–60.

Chomel BE, Rolain JM. Bartonella. In : Murray PR, Baron EJO, Jorgensen JH, et al., editors. Manual of clinical microbiology. 9th Washington : ASM Press ; 2007. p. 851–61.

Maurin M. Afipia. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2007. p. 1545–50.

Regnery RL, Olson BA, Perkins BA, et al. Serological response to Rochalimaea henselae antigen in suspected cat-scratch disease. Lancet 1992 ; 339 : 1443–5.

Rolain JM, Raoult D. Bartonella. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2007. p. 1535–44.

Stewart BA. Human infection with Bartonella species. Clin Microbiol Infect 1997 ; 3 : 677–89.

www.mediforma.ma/Bacterio/bb/henselae.html.

www.microbes-edu.org/etudiant/bartonella/bartonella.html.

30.13 *Brucella*

J.-P. Lavigne, D. O'Callaghan

Généralités

Brucella spp. sont des bactéries intracellulaires facultatives, agents d'avortements épizootiques chez plusieurs animaux notamment d'élevage et des maladies fébriles bactériémiques (fièvre de Malte) ou d'infections focalisées chez l'homme. Ce sont des coccobacilles à Gram négatif, aérobies stricts, catalase positive, oxydase habituellement positive. La plupart des souches isolées en pathologie humaine produisent une uréase d'action rapide et intense.

Habitat et pouvoir pathogène

Le genre *Brucella* a été divisé en 11 espèces selon des caractères phénotypiques (Tableau 30.42) dont quatre sont pathogènes pour l'homme : *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* (biovars 1, 3 et 4) et *B. canis*. D'exceptionnels cas d'infections atypiques à *B. suis bv2*, *B. ceti* et *B. inopinata* ont été décrits. La pathogénicité de ces espèces reste hypothétique.

La brucellose est avant tout une maladie animale (zoonose) et les animaux domestiques (bovins, ovins, caprins, porcins) constituent le réservoir de l'infection pour l'homme, hôte accidentel (anthropozoonose). En France, l'incidence de cette maladie a considérablement diminué ces dernières années (<0,1/100 000 habitants, < 50 cas déclarés par an). Des cas de contamination autochtone surviennent occasionnellement dans les régions montagneuses (Alpes, Pyrénées ou Corse par *B. melitensis*) et dans certains territoires d'outre-mer (Polynésie française par *B. suis bv1*).

Tableau 30.42 **Classification dans le genre *Brucella**.**

	Espèces	Biovars	Hôtes préférentiels
Pathogènes pour l'homme	*B. melitensis*	1–3	Caprins, ovins
	B. abortus	1–6, 9	Bovins
	B. suis	1, 3	Porcins
		2**	Porcins, léporidés
		4	Rennes
		5**	Rongeurs sauvages
	B. canis		Chiens
Pathogènes pour les animaux	*B. ovis*		Ovins
	B. neotomae *B. microti* *B. papionis* *B. ceti**** *B. pinnipedialis*		Rat du désert Campagnols, renards Babouins Cétacés, pinnipèdes, dauphins
Responsables de rares infections atypiques humaines	*B. inopinata*		1 cas d'abcès sur implants mammaires

* Chaque espèce est pathogène pour un hôte préférentiel. Parmi les différentes espèces de *Brucella* pathogènes pour l'homme, *B. suis* bv 2 et 5. Des rares infections humaines atypiques sont attribues a certains souches de *B. ceti (***)*.
Les noms exacts des espèces dans le genre *Brucella* avec les détails sur les différentes souches bactériennes peuvent être consultés sur le site internet du comité ICSP sur la taxonomie des *Brucella* (www.the-icsp.org/taxa/Brucellalist.htm).

L'homme peut se contaminer soit directement par voie cutanéomuqueuse au contact d'animaux infectés (maladie professionnelle : vétérinaire, agriculteur, éleveur, ouvrier d'abattoir), soit indirectement par voie digestive (lait, fromage) ou par inhalation de poussière ou d'aérosol de litière. Les contaminations de laboratoire représentent une des sources majeures d'infection.

Actuellement, la majorité des cas est importée de pays d'endémie (pays du Maghreb, Portugal, Turquie, par exemple) ; ce sont des infections aiguës survenant chez des personnes manipulant des cultures de ce pathogène (techniciens de laboratoire par exemple) ou des rechutes tardives d'infections anciennes.

Après une période d'incubation variable (quelques jours à plusieurs semaines, en fonction notamment de l'inoculum bactérien infectieux), la brucellose se caractérise dans sa phase aiguë par une bactériémie d'origine lymphatique. Cette phase se manifeste classiquement par une fièvre souvent élevée, permanente ou ondulante avec des suées nocturnes, des myalgies et des arthralgies (fièvre de Malte) correspondant aux passages bactériémiques. Cet état septique s'atténue ou disparaît spontanément en 2 à 3 semaines. En l'absence de diagnostic et de traitement adéquat, la plupart des patients évoluent vers une phase subaiguë, avec une bactériémie intermittente et des localisations secondaires (surtout ostéoarticulaires, plus rarement neurologiques, cardiaques,

hépatospléniques, ou génitales). Les formes chroniques se définissent par une évolution prolongée au-delà d'un an, avec ou sans découverte d'un foyer infectieux focalisé (patraquerie brucellienne, foyers secondaires osseux).

Brucella est un pathogène de classe III, considéré comme un agent potentiel du bioterrorisme. En France, toutes les *Brucella* excepté *B. ovis* sont classées comme des MOT (micro-organismes et toxines hautement pathogènes). Seuls les laboratoires autorisés peuvent donc détenir et manipuler ces bactéries et leurs matériaux génétiques (ARN/ARN > 500 bp).

Diagnostic bactériologique direct

Prélèvements

Le diagnostic de certitude de la brucellose demeure fondé sur l'isolement en culture des *Brucella*. Pour cela, la réalisation d'hémocultures aérobies lors des accès fébriles de la phase aiguë est la méthode de référence. Lors de la phase subaiguë, la myéloculture, les ponctions de liquide céphalorachidien, de ganglion ou de liquide articulaire peuvent aider au diagnostic. Les prélèvements doivent être réalisés avant tout traitement antibiotique. La culture du foyer infectieux, de sensibilité faible, peut s'avérer intéressante lors de cette phase chronique. L'isolement de *Brucella* nécessite classiquement plusieurs jours d'incubation des cultures. Toutefois, cet isolement est le plus souvent réalisé en moins de 5 jours dans les systèmes automatisés d'hémoculture. Il n'est donc pas nécessaire de prolonger l'incubation des hémocultures au-delà de 14 jours. La sensibilité des hémocultures est supérieure à 80 % en phase aiguë de la maladie, mais inférieure à 50 % en phase subaiguë ou chronique, ou si une antibiothérapie a été administrée avant prélèvement (< 10 %).

Le transport des prélèvements vers le laboratoire doit être rapide.

Lorsque les cultures sont négatives ou non réalisées, un prélèvement sanguin permet d'effectuer les sérologies. Ces sérologies représentent la majorité des diagnostics en France. Elles doivent être renouvelées 4 semaines plus tard pour confirmer un diagnostic.

Toute suspicion de brucellose doit être signalée au laboratoire réalisant la mise en culture des prélèvements biologiques car le risque de contamination du personnel technique est élevé.

L'isolement des *Brucella* nécessite des conditions de culture et de sécurité particulières pour éviter la transmission de la maladie chez le personnel de laboratoire. Ces cultures doivent être réalisées en laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 (NSB 3). Il est donc essentiel que toute suspicion clinique de brucellose soit signalée au biologiste et aux techniciens du laboratoire réalisant ces cultures.

Examen direct

La coloration de Gram (nécessitant de doubler ou tripler le temps de recoloration à la fuschine) objective des coccobacilles à Gram négatif, de petite taille (0,5–1,5 µm de long ; 0,5–0,7 µm de diamètre), immobiles, isolés ou en paire, non capsulés, non sporulés (Fig. 30.33).

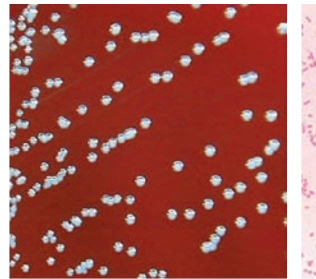
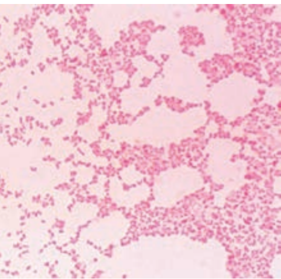



Fig. 30.33 À droite, examen direct d'une culture de *Brucella melitensis*. À gauche, aspect en culture des colonies de *Brucella* spp.

Milieux de culture

Les *Brucella* spp. pathogènes pour l'homme poussent difficilement et lentement sur les milieux de culture, nécessitant des temps d'incubation prolongé (3 jours à 3 semaines). La croissance de ces bactéries nécessite l'utilisation de milieux gélosés riches (gélose au sang frais, gélose au sang cuit avec facteurs de croissance), incubés à 35 à 37 °C, en atmosphère contenant 5 % de CO_2, pendant 3 à 4 semaines. Certaines souches (*B. abortus*, *B. ovis*) se développent mieux en atmosphère contenant 5 à 10 % de CO_2. La température de croissance optimale est 34 °C avec un pH à 6,8.

La thiamine, la niacine et la biotine sont des vitamines indispensables. Les colonies sont très fines, de 0,5 mm de diamètre, transparentes, légèrement bleutées, bombées à bord régulier et non hémolytiques. L'exigence en CO_2 doit être déterminée sur la primoculture ou au plus tard sur le premier repiquage.

Certaines espèces (*B. microti*, *B. inopinata*, *B. suis bv5*) dont la pathogénicité chez l'homme n'est pas prouvée ont une croissance rapide (colonies en 24 heures).

Diagnostic d'espèce

Caractères biochimiques (Tableaux 30.43 et 30.44)

Si le diagnostic de genre pour les *Brucella* est relativement aisé, le diagnostic d'espèce relève le plus souvent d'un laboratoire de référence. Toutes les souches doivent être envoyées au Centre national de référence (CNR) des *Brucella* pour confirmation du diagnostic en respectant la législation existante pour ce micro-organisme de classe 3 (réglementation de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [ANSM]). Les souches doivent ensuite être détruites et éliminées (car elles appartiennent aux MOT).

Les *Brucella* spp. sont aérobies strictes et ont une catalase + (à ne réaliser que sous un PSM) et une oxydase + (sauf *B. ovis* et *B. neotomae*) (Tableau 30.43). Ces bactéries ne fermentent pas les sucres. La majorité des autres caractères métaboliques sont négatifs : production d'indole, réaction de Voges-Proskauer, citrate de Simmons, etc. En revanche, les *Brucella* spp. ont une nitrate réductase +, sauf *B. ovis*.

Du fait d'une faible réactivité biochimique, l'identification de ces bactéries par les méthodes phénotypiques usuelles est difficile. L'utilisation de galeries d'identification de type API-NE® (bioMérieux) peut conduire à une fausse identification de *Moraxella phenylpyruvica*. De plus, elle expose le technicien à des aérosols.

Tableau 30.43 Différenciation des espèces de *Brucella*.

Caractères / Espèces	*B. melitensis*	*B. suis*	*B. abortus*	*B. canis*	*B. neotomae*	*B. ovis*	*B. pinnipediae* (provisoire)
Oxydase	+	+	+	+	–	–	
Exigence en CO_2	–	–	+[b]	–	–	+	– B.p/+ B.c
Production d'H_2S	–	+++ (1–6 j)	+[c] (2–5 j)	–	+	–	–
Hydrolyse de l'urée	>90 min	<90 min	>90 min	<90 min	>90 min	–	+
Sérum monospécifique							
– A	+ (sauf M1)	+	±	–	+	–	
– M	+	–	±	–	–	–	
Sérum monospécifique R (souche *rough*)	–	–	–	+	–	+	–
Sensibilité à des colorants bactériostatiques :							
– Fuschine basique	R	S[a]	R[d]	S/R	S	S	R
– Thionine	R	R	S	R	S	R	R
– Safranine	S	R	S	S	S	S	S
Amplification génique PCR							
– *Omp31* et *Omp25*	+	+	+	+	+	+	
– PCR IS711	+	+	+	+	+	+	
Lysotypie : bactériophages							+ B.p/–B.c
– Tb	–	–	+	–	±	–	
– Wb	–	+	+	–	+	–	

[a] , sauf bv 3 ; [b], sauf bv 5, 6, 9 ; [c], sauf bv 5 ; [d], sauf bv 2.
Encadré noir : tests accessibles à tout laboratoire.
R, résistant ; S, sensible.

Enfin, une technique d'agglutination avec les sérums polyvalents et monospécifiques permettait d'orienter le diagnostic. Cette méthode, dangereuse pour le technicien du fait des risques de contamination, ne doit plus être réalisée.

Classification des espèces

L'identification d'espèce, réservée en pratique aux laboratoires spécialisés, reposait sur (Tableau 30.43) :

- la lysotypie en évaluant la sensibilité à différents bactériophages (Tb, Wb, Bk, etc.) ;
- la production d'H_2S, qui est variable selon les espèces ;
- l'hydrolyse de l'urée grâce à l'activité plus ou moins intense d'une uréase présente chez toutes les *Brucella* à l'exception de *B. ovis* ;
- l'étude de l'oxydation des glucides et des acides aminés et l'étude de l'action bactériostatique de la fuchsine basique et de la thionine.

Ces techniques sont maintenant abandonnées au profit des outils de biologie moléculaire.

Diagnostic génomique

Les techniques d'amplification génique sont du ressort du CNR des *Brucella*. La PCR et la PCR en temps réel sont apparues comme des techniques sensibles et spécifiques, particulièrement utiles dans le cas où l'administration d'une antibiothérapie empirique empêche l'isolement de *Brucella*. L'amplification peut s'effectuer à partir du sang ou du sérum, mais aussi dans diverses suppurations ou biopsies tissulaires. À partir du prélèvement, la sensibilité de la PCR est variable selon les études (50 à 100 %), et la spécificité est comprise entre 60 et 98 %. Ces variations sont classiquement dues aux différentes méthodes d'extraction, méthodes de détection et au type de prélèvements. La présence d'inhibiteurs de l'ADN polymérase dans les échantillons cliniques peut conduire à de faux négatifs, alors que les contaminations de laboratoire ou plus rarement des réactions d'amplification croisée peuvent induire des faux positifs.

Plusieurs tests de PCR ont été développés pour l'identification des *Brucella* à partir de souches bactériennes ou directement à partir de liquides biologiques. Une amplification du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S suivie d'un séquençage permet l'identification d'une bactérie du genre *Brucella*. Toutefois, des séquences 16S incorrectement attribuées au genre *Brucella* sont présentes dans la banque de données Genbank pouvant conduire à des faux positifs. La séquence d'insertion *IS*711 est une bonne cible fréquemment utilisée car elle est spécifique de *Brucella* et présente en multiples copies dans le génome, augmentant ainsi la sensibilité de la détection. D'autres cibles ont été utilisées comme les gènes codant pour Bscp31 et la perosamine synthase Per.

La PCR est également utilisée pour déterminer les espèces de *Brucella*. Une PCR multiplex (Bruce-Ladder) permet ainsi l'identification de toutes les espèces isolées aussi bien chez l'homme que chez les animaux. Elle a été récemment modifiée afin d'identifier les nouvelles espèces (*B. microti* et *B. inopinata*). Enfin, l'avènement des MLSA (*multilocus*

Tableau 30.44 **Différenciation entre *Brucella* spp. et les autres coccobacilles à Gram négatif exigeants.**

Test	*Brucella* spp.	*Bordetella bronchiseptica*	*Acinetobacter* spp.	*Haemophilus influenzae*	*Pasteurella* spp.	*Yersinia pestis*	*Eikenella corrodens*	*Moraxella phenylpyruvica*	*Cardiobacterium hominis*	*Oligella ureolytica*
Agglutination avec un antisérum de *Brucella*	+[a]	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Oxydase	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	–	d	–	+
Mobilité	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+/–
Uréase	+	+	+/–	+/–	–	–	–	+	–	+
Réduction du nitrate	+	+	–	NA[b]	+	+	+	+	–	+
Croissance sur gélose au sang	+	+	+	–	+	+ lente	corrosion	+	+	+
Croissance en anaérobiose	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
Morphologie au Gram	Coccobacille à Gram négatif, très court, rose pâle	Petit bacille ou coccobacille à Gram négatif, brillant	Bacille ou coccobacille à Gram négatif large et brillant, groupés par 2 ou en chaînette	Coccobacille à Gram négatif de petite taille	Bacille ou coccobacille à Gram négatif, groupés par 2, coloration bipolaire	Coccobacille à Gram négatif polymorphe, parfois à coloration bipolaire, aspect d'épingle de sûreté	Coccobacille à Gram négatif, droit, fin	Coccobacille à Gram négatif, très court, brillant	Coccobacille à Gram négatif à extrémités bulleuses (retenant le violet de gentiane), groupé le plus souvent en rosette	Coccobacille à Gram négatif, très court, se décolorant parfois mal, droits, aux extrémités arrondies

a *B. canis* a une oxydase variable et n'agglutine pas avec les antisérums de *Brucella*.
b NA, non applicable.
d : variable.

sequence analysis) a permis la discrimination des souches au niveau du biovar, tandis que les systèmes de typage par MLVA (*multilocus variable number of tandem repeats analysis*) sont utilisés pour identifier des clusters bactériens associés à des épidémies. Ces techniques restent encore coûteuses et longues et ne sont réalisées que par les CNR.

Diagnostic protéique

La spectrométrie de masse (MALDI-TOF) est une technologie en pleine expansion en microbiologie du fait de sa rapidité, de sa précision et de son faible coût. Devant l'absence de base de données en IVD (In Vitro Diagnostic system) et le manque de sécurité lors du dépôt de la colonie bactérienne sur la lame, plusieurs épisodes de contamination du personnel des laboratoires ont été observés.

Devant tout coccobacille à Gram négatif issu d'hémocultures, il est donc essentiel de prendre des précautions.

Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Actuellement, la détermination de la sensibilité de *Brucella* spp. aux antibiotiques n'est pas indispensable. Les souches sont très majoritairement sensibles aux antibiotiques couramment prescrits contre cette infection (Tableau 30.45) et il y a un fort risque de contamination du personnel de laboratoire. *Il est donc formellement contre-indiqué d'effectuer cette recherche.* Seule la souche vaccinale RB51 est résistante à la rifampicine, mais elle n'est que très peu présente en Europe. Si un antibiogramme est tout de même réalisé, il doit être exclusivement réalisé par le CNR *Brucella* devant un cas particulier.

Sérodiagnostic (Tableau 30.46 et Fig. 30.34)

La sérologie n'est utile que lorsque la culture bactérienne est négative ou non réalisée. Elle nécessite l'utilisation de plusieurs techniques, et pose le problème essentiel de son manque de spécificité liée à la fréquence des faux positifs par réactions sérologiques croisées. De nombreuses trousses diagnostiques sont commercialisées. La détection des anticorps spécifiques se fait en moyenne 2 à 3 semaines après l'infection par *Brucella*. La plupart de ces tests utilisent comme antigène des suspensions inactivées de *B. abortus*, et détectent principalement les anticorps anti-LPS. Aucun de ces tests ne permet un diagnostic de certitude de brucellose. La valeur prédictive positive des tests sérologiques est faible, en particulier dans les pays où la prévalence de la brucellose est faible, comme la France. Les sérologies doivent être interprétées en corrélation avec le tableau clinique.

Tableau 30.45 **Antibiotiques actifs in vitro et efficacités in vivo sur *Brucella* spp.**

Familles d'antibiotiques actives in vitro	Efficacité in vivo	Molécules à utiliser
β-lactamines	+	Pénicillines A, céphalosporines de 3e génération (céfotaxime et ceftriaxone), imipénem
Macrolides	+	Azithromycine, érythromycine
Chloramphénicol	+	Chloramphénicol
Sulfamides	V[a]	Cotrimoxazole
Aminosides	+++	**Gentamicine,** nétromycine, tobramycine, **streptomycine**
Tétracyclines	++++	Doxycycline
Rifampicine	+++	Rifampicine
Fluoroquinolones	++	**Ciprofloxacine, ofloxacine**

[a] V, variable en fonction des espèces ; en gras, les antibiotiques recommandés par l'OMS.

Tableau 30.46 **Principaux tests sérologiques utilisables dans le diagnostic des brucelloses.**

Tests	Fournisseurs	Temps nécessaire à la positivité des résultats	Persistance de la positivité	Avantages–inconvénients
Épreuve de l'antigène tamponnée (test au rose Bengale) : agglutination rapide sur lame	BioRad BioMérieux J2L Elitech	3–4 semaines	>1 an après la fin de la bactériémie	Simple, rapide, sensible, technique de dépistage qualitatif des IgG Nombreux faux positifs (confirmation des tests positifs par une autre technique), cinétique des anticorps décalée restant plus longtemps positive comparée à SAW
Séro-agglutination de Wright (SAW) : agglutination lente en tubes	BioRad JEL Elitech	10–15 jours après l'infection	<1 an après la fin de la bactériémie	Technique de référence semi-quantitative (IgM, IgG) Faux positifs (réactions croisées), faux négatifs (phénomène de zone, anticorps bloquants)
ELISA	MP BioMedicals BioMérieux	>4 semaines	Tardive (>18 mois)	Titrage spécifique IgG, IgA et IgM, très utile en cas de brucellose chronique, sensibilité excellente, meilleure spécificité, diminution des réactions croisées Tardive
Immunofluorescence indirecte		>4 semaines	Tardive (>18 mois)	Titrage spécifique IgG, IgA et IgM, très utile en cas de brucellose chronique, sensibilité excellente, rapidité (2–3 heures) Tardive, lecture subjective

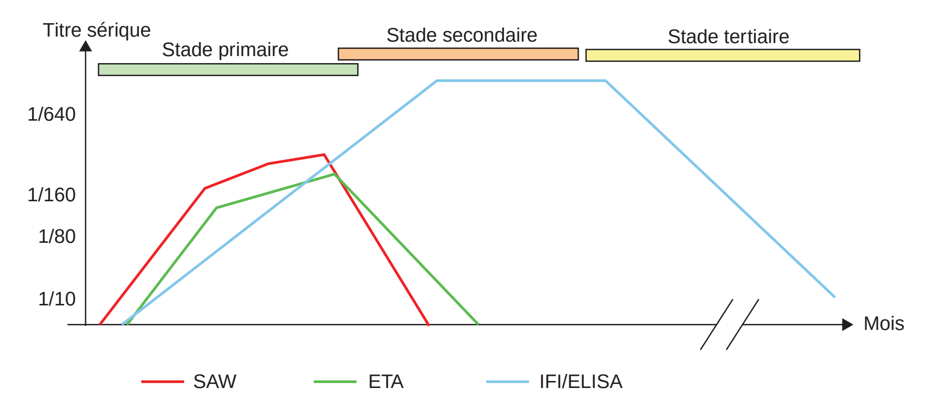


Fig. 30.34 **Cinétique d'évolution des anticorps au cours de la brucellose.**

Technique d'agglutination en tube ou séroagglutination de Wright (SAW)

C'est la première technique sérologique décrite (en 1897) qui demeure la référence préconisée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) du fait de sa standardisation (sérum étalon international permettant une réponse en unités internationales). La SAW est un test de séroagglutination lente en tube (lecture à 24 heures). Les antigènes détectés sont de type IgM +++ et IgG +. Un titre à 160 est actuellement considéré comme le seuil de positivité en zone non endémique. Ce taux croît au fil du temps et peut atteindre, après quelques mois, des dilutions ≥ 1/5120. Les IgM peuvent être détectées dans les 2 à 3 semaines suivant l'infection, suivies des IgG. Après traitement, les IgG peuvent persister pendant plus d'un an. Un taux supérieur et persistant doit faire rechercher un foyer en évolution; les IgM se négativant assez rapidement.

Des faux négatifs sont observés par phénomène de zone en excès d'anticorps (d'où la nécessité de tester d'emblée plusieurs dilutions du sérum), ou du fait de la présence d'anticorps bloquants (à rechercher systématiquement par ajout d'un sérum témoin positif à la réaction). Les faux positifs sont dus à des réactions sérologiques croisées, surtout avec *Yersinia enterocolitica* O:9, mais aussi *Francisella tularensis*, *Escherichia hermanii*, *E. coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Afipia clevelandensis*, *Ochrobactrum anthropi*, *Stenotrophomonas maltophilia* ou les vaccinations contre le choléra (*V. cholerae* O:1). Ils peuvent être évités en diluant systématiquement les sérums au-delà de 1/320. Il faut noter que la SAW ne permet pas de détecter les anticorps contre *B. canis*. Cette bactérie nécessite la recherche d'antigènes de la protéine majeure de la membrane externe (par exemple Omp25).

Technique d'agglutination sur lame ou épreuve de l'antigène tamponné (EAT) (ou test au rose Bengale)

C'est une méthode de criblage rapide (5 à 10 minutes) par agglutination sur lame ou sur carte à usage unique en utilisant le sérum non dilué et une suspension en milieu acide (pour inhiber les agglutinines non spécifiques) et tamponné de *B. abortus* inactivées et colorées au rose Bengale. Elle permet la détection d'anticorps agglutinants de type IgG et IgM. La réponse est positive précocement (2 à 3 semaines) et la sensibilité de la technique est très élevée (>95 %). La persistance parfois très longue des anticorps expose au risque de croire l'infection toujours évolutive avec pour corollaire une poursuite inutile de l'antibiothérapie. Ce test est très utile en zone d'endémie mais présente les mêmes limites que la SAW (réactions croisées).

Autres techniques sérologiques disponibles

Ces techniques comprennent principalement la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI), les tests de microagglutination, les tests de Coombs indirect et les tests ELISA. Ces méthodes permettent d'apprécier au mieux le stade de l'infection en évaluant les divers isotypes d'anticorps. Les IgM ont valeur d'infection aiguë récente ou actuelle; les IgA d'une infection focale traînante.

L'IFI est très sensible et est classiquement plus tardive que la SAW ou l'EAT. Elle peut donc être utilisée tout au long de l'évolution de la maladie (formes chroniques de brucellose). Elles complètent la SAW en limitant les faux négatifs et les faux positifs. Des titres en anticorps spécifiques > 160 en IgG-IFI sont habituellement considérés comme valeur seuil. L'ELISA est un test intéressant en cas de brucellose chronique, compliquée ou localisée quand les autres tests sont négatifs. Cette technique est coûteuse et manque également de spécificité. Elle est réservée aux enquêtes séro-épidémiologiques pour lesquelles un grand nombre d'échantillons de sérum sont testés.

La persistance prolongée des anticorps après infection ne permet pas d'interpréter de façon fiable un titre sérologique unique. On recherche donc une séroconversion ou une multiplication par 4 au moins des titres sérologiques entre deux sérums, l'un prélevé en phase aiguë et l'autre en phase de convalescence.

Démarche diagnostique

Les figures 30.35 et 30.36 résument les différentes étapes pour parvenir au diagnostic de brucellose.

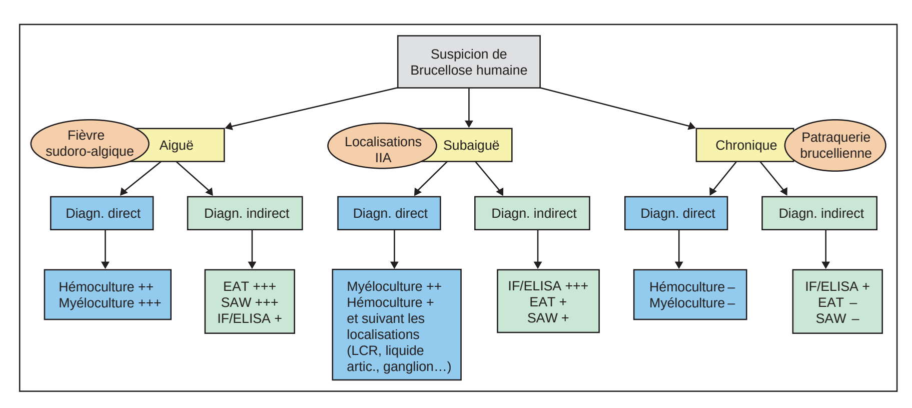


Fig. 30.35 Intérêts des différents prélèvements microbiologiques dans le diagnostic des brucelloses.

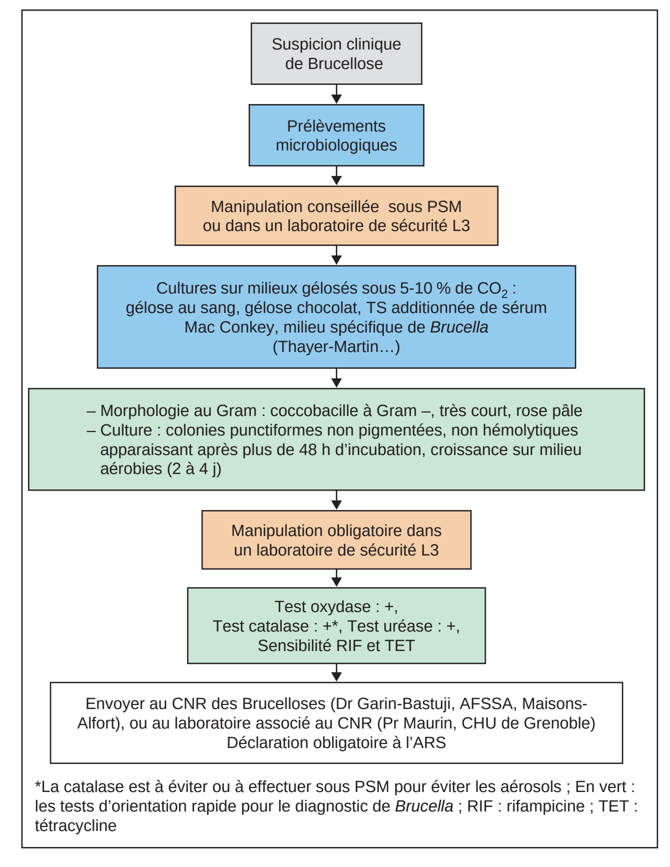


Fig. 30.36 Étapes du diagnostic bactériologique de *Brucella* spp.

Pour en savoir plus

Al Dahouk S, Scholz HC, Tomaso H, et al. Differential phenotyping of Brucella species using a newly developed semi-automated metabolic system. BMC Microbiol 2010; 10 : 269.

Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. Int J Antimicrob Agents 2010; 36S1 : S12–7.

Boschiroli ML, Foulongne V, O'Callaghan D. Brucellosis : a worldwide zoonosis. Curr Opin Microbiol 2001; 4 : 58–64.

Bounaadja L, Albert D, Chenais B, et al. Real-time PCR for identification of Brucella spp. : a comparative study of IS711, bcsp31 and per target genes. Vet Microbiol 2009; 137 : 156–64.

CMIT. Brucellose. In : Pilly E, editor. Maladies infectieuses et tropicales. Paris : Vivactis Plus; 2010. p. 280–1.

Durr U, Valenciano M, Vaillant V. La brucellose humaine en France de 1998 à 2000. Surveillance Nationale des maladies infectieuses. Institut de Veille Sanitaire; 2003 Rapport 1998-2000.

Franco MP, Mulder M, Gilman RH, et al. Human brucellosis. Lancet Infect Dis 2007; 7 : 775–86.

García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, et al. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all Brucella species and the vaccine strains Brucella abortus S19 and RB51 and Brucella melitensis Rev1. Clin Chem 2006; 52 : 779–81.

Klietmann WF, Ruoff KL. Bioterrorism : implications for the clinical microbiologist. Clin Microbiol Rev 2001; 14 : 364–81.

Lista F, Reubsaet FA, De Santis R, et al. Reliable identification at the species level of Brucella isolates with MALDI-TOF-MS. BMC Microbiol 2011; 11 : 267.

Maurin M. La brucellose à l'aube du 21e siècle. Méd Mal Infect 2005 ; 35 : 6–16.
Mayer-Scholl A, Draeger A, Göllner C, et al. Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described Brucella species. J Microbiol Methods 2010 ; 80 : 112–4.
Navarro E, Fernandez JA, Escribano J, et al. PCR assay for diagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 1654–5.
Pappas G, Akritidis N, Tsianos E. Effective treatments in the management of brucellosis. Expert Opin Pharmacother 2005 ; 6 : 201–9.
Redkar R, Rosa S, Bricker B, et al. Real-time detection of Brucella abortus, Brucella melitensis and Brucella suis. Mol Cell Probes 2001 ; 15 : 43–52.
Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterisation of Brucella species. Rev Sci Tech 2013 ; 32 : 149–62.
Shapiro DS, Wong JD. Brucella. In : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al., editors. Manual of clinical microbiology. Washington DC : American Society for Microbiolgy ; 1999. p. 625–31.
Vrioni G, Pappas G, Priavall E, et al. An eternal microbe : Brucella DNA load persists for years after clinical cure. Clin Infect Dis 2008 ; 46 : e131–6.
Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect Genet Evol 2009 ; 9 : 1168–84.

Adresses utiles

Centre national de référence de *Brucella*
Dr Claire Ponsart
ANSES
Laboratoire de santé animale, unité zoonoses bactériennes
14, rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons Alfort cedex
Tél. : 01 49 77 13 23 ou 46 23 – Fax : 01 49 77 13 44
E-mail : cnr.brucella@anses.fr

Centre national de référence *Brucella* – Laboratoire associé
Pr Jean-Philippe Lavigne, Dr David O'Callaghan
CHU de Nîmes, service de microbiologie
Place du Pr Robert Debré, 30029 Nîmes cedex 09
Et INSERM U1047, UFR de médecine
186, chemin du Carreau de Lanes, 30908 Nîmes cedex 2
Tél. : 04 66 68 32 02 ou 04 66 02 81 46 – Fax : 04 66 02 81 48
E-mail : cnr.brucella@anses.fr

30.14 *Legionella*

A.-G. Ranc, L. Beraud, G. Descours, G. Lina, S. Jarraud

Épidémiologie et habitat

Les *Legionella* sont des bactéries de l'environnement, qui trouvent leurs conditions de croissance idéales dans les environnements chauds et humides mais sont également capables de survivre dans des conditions extrêmes. Leur habitat naturel est l'eau douce (lacs, rivières, étangs, flaques, etc.), mais les *Legionella* peuvent également être isolées du sol. Cependant, ces sources naturelles sont rarement en cause dans les cas de légionellose, les conditions environnementales n'étant pas favorables au développement de la bactérie en quantité suffisante. Les infections sont souvent liées à des écosystèmes artificiels au sein desquels la bactérie trouve les conditions idéales à sa prolifération. Ainsi, les sources les plus fréquemment retrouvées sont les tours aéroréfrigérantes (TAR), les chauffe-eaux, les systèmes de distribution d'eau potable avec stagnation (bras morts, réservoirs), les bains bouillonnants, les piscines thermales, les fontaines décoratives, etc. Les composts et terreaux ont également été impliqués dans des cas de légionellose dus à l'espèce *Legionella longbeachae*, infection bien décrite notamment en Australie et Nouvelle-Zélande.

La légionellose est une pneumonie de l'adulte, rare chez les personnes de moins de 20 ans et exceptionnelle chez l'enfant. En France, le nombre de cas annuel est relativement stable, variant entre 1200 et 1500 cas annuels notifiés (données Institut national de veille sanitaire [InVS]). Cela correspond à un taux d'incidence d'environ 2 cas/100 000 habitants/an. On observe un gradient Est–Ouest en France avec des taux d'incidence pouvant aller de 4,6 en Franche-Comté à 0,8 en Bretagne, faisant suggérer un lien entre légionellose et conditions météorologiques. Plusieurs études européennes ont suggéré un lien entre incidence et changement climatique comme l'augmentation des précipitations. Les légionelloses sont rapportées toute l'année, mais un pic saisonnier est observé avec plus de la moitié des cas survenant entre juin et octobre. La plupart des cas de légionellose sont sporadiques, les cas groupés (définis par au moins deux cas, survenus dans un intervalle de temps et d'espace géographique susceptible d'impliquer une source commune de contamination) représentant environ 10 % des cas (données 2010–2014 de l'European Center for Disease Prevention and Control [ECDC]). Ces cas groupés correspondent à des épidémies survenant dans des hôpitaux, des hôtels, des immeubles avec eau chaude collective, ou bien sont liés à des émissions par des TAR.

Parmi les 58 espèces et 16 sérogroupes de *Legionella* décrits, *L. pneumophila* est responsable de la grande majorité des cas de légionelloses (90 % environ), parmi lesquels le sérogroupe 1 prédomine dans 85 % des cas. D'autres espèces de *Legionella* peuvent également être impliquées en clinique, mais elles concernent surtout des patients immunodéprimés. On retrouve principalement les espèces *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feelei*, *L. wadsworthii* et *L. anisa*. Cependant, les infections liées aux autres sérogroupes de *L. pneumophila* (sérogroupes 2 à 16) ainsi qu'aux autres espèces de *Legionella* sont probablement sous-estimées, la recherche des antigènes urinaires, test diagnostic de première ligne, ciblant principalement *L. pneumophila* sérogroupe 1 (Lp1).

Physiopathologie

Legionella est une bactérie de l'environnement dont l'hôte naturel est les amibes, jusqu'à entraîner leur lyse, et peut également infecter accidentellement l'homme en se multipliant dans les macrophages alvéolaires suite à l'inhalation de microgouttelettes d'eau contaminées, entraînant une pneumonie appelée légionellose. La capacité de *Legionella* à infecter ses cellules hôtes, amibes ou macrophages, est dépendante du système de sécrétion de type IV (SST4) Dot/Icm, qui sécrète près de 300 protéines bactériennes, appelées effecteurs, dans le cytosol de la cellule hôte. Ces effecteurs sont impliqués dans la modulation du trafic vésiculaire de la cellule hôte et des voies de maturation endosomales permettant la multiplication

intracellulaire de la bactérie, la lyse des cellules et la libération de nouvelles bactéries dans le milieu environnant.

Pouvoir pathogène

Legionella est responsable de trois entités cliniques : la maladie des légionnaires ou légionellose, la fièvre de Pontiac et les formes extrapulmonaires.

La forme la plus courante, appelée maladie des légionnaires, est caractérisée par une atteinte pulmonaire de sévérité variable. Après une période d'incubation allant en général de 2 à 10 jours, un syndrome pseudogrippal s'installe progressivement sur 2 à 3 jours. Le tableau clinique associe classiquement pneumonie sévère aiguë, confusions (30 % des cas) et troubles digestifs et, au niveau biologique, cytolyse hépatique, hyponatrémie et atteinte rénale. L'échec d'un traitement probabiliste par β-lactamines ainsi qu'une fièvre élevée, supérieure à 39 °C (en comparaison à la pneumopathie à pneumocoque), doivent faire orienter le diagnostic vers cette pathologie. Le taux de mortalité, autour de 11 % (données InVS), reste stable malgré l'utilisation d'outils de diagnostic rapide comme la détection des antigènes urinaires. Ce taux est cependant fonction du statut immunitaire du patient, pouvant aller jusqu'à 25 % chez des patients immunodéprimés. D'autres facteurs tels que l'âge, le sexe féminin, une corticothérapie, l'apparition d'une insuffisance rénale et une valeur de CRP ≥ 500 mg/l sont également des facteurs de mauvais pronostic. Au niveau de l'imagerie, la pneumopathie à légionelles est le plus souvent à l'origine d'une atteinte bilatérale, asymétrique, alvéolaire ou alvéolo-interstitielle. On peut également observer un épanchement pleural chez un tiers des patients.

La légionellose a ainsi une place importante au sein des pneumopathies communautaires et serait le deuxième ou troisième agent en cause après *Streptococcus pneumoniae*. Selon les études, elle serait impliquée dans 0,5 à 10 % des pneumopathies communautaires. Moins de 10 % des légionelloses sont d'origine nosocomiale en France.

Les formes extrapulmonaires restent rares et apparaissent surtout chez des patients immunodéprimés. Elles peuvent être contemporaines de la pneumonie ou apparaître secondairement, voire précéder la pneumonie. Il a été décrit des formes neurologiques, cardiaques, digestives, rénales, musculaires, cutanées ou encore articulaires.

Legionella est également responsable d'un syndrome pseudogrippal sans pneumonie appelé fièvre de Pontiac. La guérison est spontanée en quelques jours et peut passer inaperçue. Le diagnostic est principalement rétrospectif grâce à la sérologie. Les antigènes urinaires peuvent se positiver. La fièvre de Pontiac est caractérisée par un taux d'attaque important allant de 70 à 90 %, contrairement à la maladie des légionnaires (taux d'attaque entre 0,5 à 7 %). Du fait de l'absence de pneumonie, la fièvre de Pontiac n'est pas ou exceptionnellement diagnostiquée en France.

Diagnostic biologique

La légionellose est une maladie à déclaration obligatoire. Un cas de légionellose, pour être déclaré, doit toujours être confirmé par des arguments biologiques. Ainsi, les cas sont définis par une pneumopathie associée à au moins un des résultats suivants :

- pour les cas confirmés :
  - isolement de *Legionella* spp. d'un prélèvement du patient ;
  - augmentation du titre d'anticorps (×4) avec un deuxième titre minimal de 128 ;
  - présence d'antigènes solubles urinaires.
- pour les cas probables :
  - titre d'anticorps élevé (≥ 256) ;
  - PCR positive.

Une proposition de stratégie diagnostique dans les cas de suspicion de légionellose au laboratoire est détaillée dans la figure 30.37.

Recherche d'antigènes urinaires

La détection des antigènes urinaires représente le test de diagnostic de première ligne, par sa rapidité, sa précocité et sa simplicité de réalisation. Les tests les plus couramment utilisés sont fondés sur des techniques d'immunochromatographie avec détection d'un signal colorimétrique ou fluorescent ou d'immuno-enzymologie. Ils permettent ainsi de poser un diagnostic dans un délai compris entre 15 minutes et 4 heures.

Les antigènes détectés sont de nature lipopolysaccharidique. Ils sont excrétés dans les urines de manière précoce (dans les trois premiers jours suivant l'apparition des symptômes). Ils peuvent rester positifs sur une durée plus ou moins longue suivant les patients : en général, l'excrétion dure de quelques jours à 40 jours, mais chez certains patients immunodéprimés, elle peut persister plus d'un an. La durée d'excrétion de ces antigènes peut ainsi représenter un facteur limitant le diagnostic de rechute ou de récidive de légionellose.

Les tests actuellement commercialisés sont validés pour la détection de *L. pneumophila* sérogroupe 1, sérogroupe impliqué dans plus de 85 % des cas de légionellose. Du fait de l'existence de réactions croisées entre les sérogroupes, des tests peuvent détecter d'autres sérogroupes sans que la sensibilité vis-à-vis de ces sérogroupes n'ait pu être évaluée en raison de la faible incidence des légionelloses à *L. pneumophila* non sérogroupe 1. Selon les tests et les études, la sensibilité est comprise entre 70 et 90 %. Cette sensibilité est d'autant plus faible dans les cas de légionelloses nosocomiales, en lien avec les caractéristiques des souches impliquées dans ces pathologies (Lp1 présentant un épitope particulier, Lp sérogroupes 2 à 16, autres espèces que Lp). Pour certains tests commercialisés, une concentration préalable des urines par ultracentrifugation (Fig. 30.38) augmente la sensibilité de la technique sans en diminuer la spécificité. Cependant, pour les tests utilisant l'immunofluorescence comme méthode de détection, ce prétraitement par concentration est à proscrire car il entraîne une diminution de la spécificité du test.

La spécificité de ces tests est très bonne. Les réactions croisées restent exceptionnelles mais peuvent être fonction du test utilisé. Afin d'éliminer les faux positifs, il est recommandé pour toute antigénurie positive de tester à nouveau les urines après un chauffage à 100 °C pendant 5 minutes

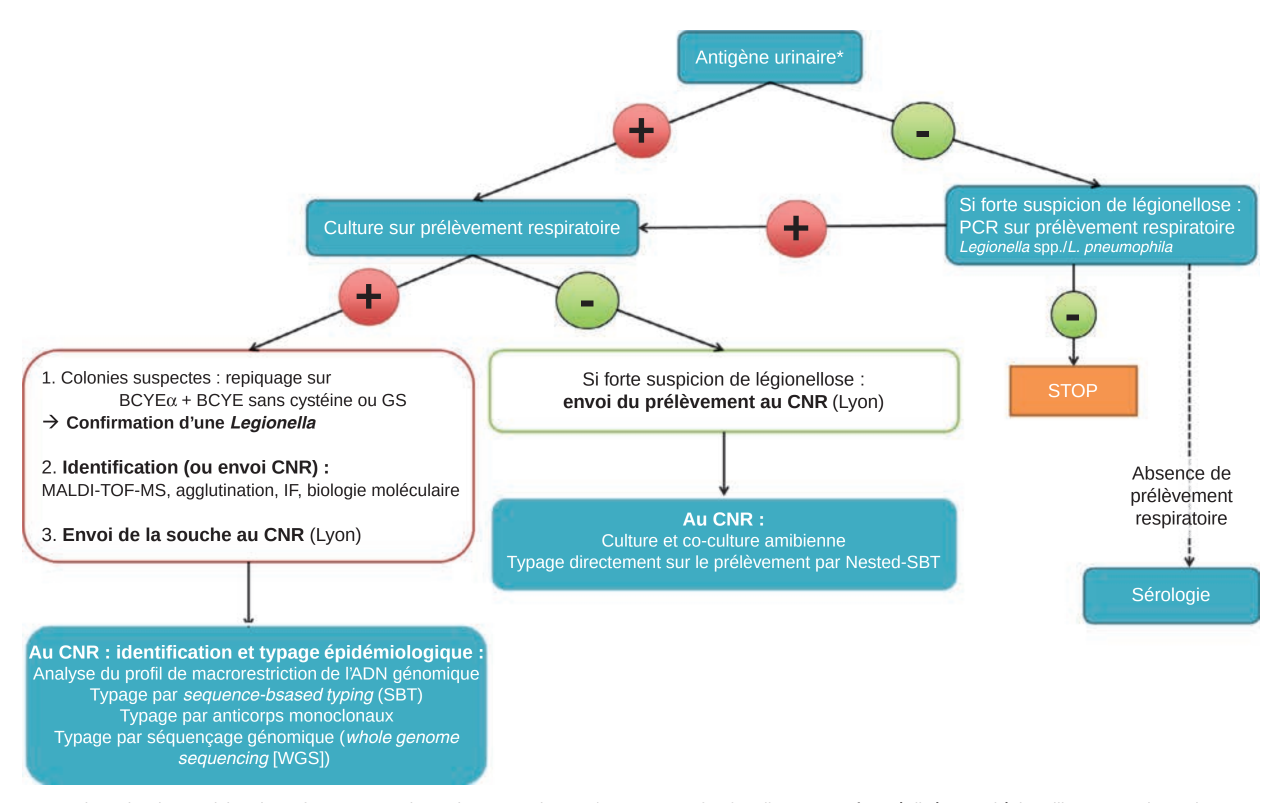


Fig. 30.37 Proposition de stratégie diagnostique d'une légionellose.



Fig. 30.38 Système de concentration des urines par ultracentrifugation.

suivi d'une centrifugation à 1000 g pendant 15 minutes, permettant de déprotéiniser l'échantillon sans altérer l'antigène polysaccharidique de *Legionella*.

Détection de *Legionella* par amplification génique

La PCR peut être réalisée sur de nombreux prélèvements mais présente son plus grand intérêt sur les prélèvements respiratoires bas. Elle peut également être réalisée sur sérum ou sur sang total (prélevé sur EDTA), mais ne doit pas être privilégiée du fait de sa moindre sensibilité et sera donc réservée aux cas avec investigation environnementale en absence de prélèvements pulmonaires (groupe Rémic 2015). La PCR réalisée sur urines n'est pas recommandée, en lien avec la faible sensibilité observée sur ce type de prélèvements.

Outre une sensibilité élevée (85 à 100 % sur les prélèvements respiratoires bas selon les études), elle a comme intérêt principal de détecter potentiellement toutes les espèces de *Legionella* et tous les sérogroupes de Lp. Il existe des réactifs commercialisés dont les principaux gènes cibles des PCR sont, pour *Legionella* spp., l'ARN ribosomal 5S ou 16S, l'espace intergénique 23S–5S et, pour *Legionella pneumophila*, le gène *mip* (*macrophage infectiosity potentiator*). Le taux initial d'ADN de *Legionella* dans les prélèvements pulmonaires et le sérum ainsi que son suivi dans les prélèvements pulmonaires par PCR en temps réel pourrait être utilisé comme un marqueur pronostic de sévérité.

Une PCR spécifique de Lp1 ciblant le gène *wzm* a également été développée mais n'est pas commercialisée à ce jour.

Culture

Bien que la recherche d'antigènes urinaires soit la technique de diagnostic de première ligne par sa facilité et sa rapidité

de réalisation, les prélèvements pulmonaires en vue d'une mise en culture ne doivent pas être négligés. En effet, l'isolement de la souche pourra permettre la réalisation d'un typage ainsi qu'une enquête épidémiologique. Néanmoins, une souche est actuellement isolée dans seulement 1 cas sur 4 cas de légionellose confirmé. C'est en lien avec le manque de sensibilité de la méthode du fait des caractéristiques culturales de la bactérie (milieux particuliers, culture longue), mais c'est également en lien avec l'absence de prescription de prélèvement pulmonaire systématique chez ces patients. Ainsi, devant tout antigénurie positive, il est recommandé de réaliser un prélèvement pulmonaire. La stratégie de mise en culture des prélèvements est représentée dans la figure 30.39.

Nature des prélèvements

La culture peut être réalisée à partir de tout type de prélèvement respiratoire bas (crachats, aspiration bronchique, LBA, etc.). Contrairement à la bactériologie classique, aucun prélèvement ne doit être refusé par le laboratoire sur des critères de « qualité » (quantité de polynucléaires par exemple).

L'idéal est de réaliser les prélèvements au moment du diagnostic, mais un prélèvement réalisé après plusieurs jours d'antibiothérapie adaptée devra tout de même être ensemencé. En effet, dans les formes sévères, une culture positive persistante malgré la présence d'antibiotiques a été observée.

Des échantillons autres que respiratoires peuvent être ensemencés dans le cadre de légionellose extrapulmonaire (tels que liquide articulaire, végétation cardiaque, etc.).

Conservation des prélèvements

Legionella est stable dans des prélèvements cliniques conservés à +4 °C. Dans le cas où la culture ne peut être réalisée immédiatement après réception au laboratoire, les prélèvements doivent être conservés à +4 °C dans le but d'inhiber la croissance de bactéries ou de levures oropharyngées contaminantes, à croissance plus rapide que *Legionella*. Pour une conservation sur le long terme, il est alors recommandé de les conserver à –20 °C (Groupe Rémic, 2015).

Prétraitement de l'échantillon

Les expectorations et les prélèvements épais doivent être fluidifiés par un agent mucolytique (dithiothréitol ou N-acétyl-cystéine). Il est souhaitable de réaliser ensuite un lavage, ces fluidifiants pouvant inhiber la croissance des légionelles. Les échantillons sont alors centrifugés et les culots repris dans le volume nécessaire à l'ensemencement. Les échantillons liquides de volume important peuvent être concentrés par centrifugation avant ensemencement. Les échantillons solides doivent être broyés dans de l'eau stérile, de préférence garantie sans ADN exogène (*DNA-free*) dans l'hypothèse où une PCR serait réalisée ultérieurement.

Un prétraitement des échantillons respiratoires pourra être nécessaire en deuxième intention en présence d'une forte contamination des géloses en première lecture. Ces prétraitements ont pour but d'inhiber la flore contaminante oropharyngée par :

- acidification : traitement du prélèvement volume à volume par une solution tampon de pH = 2, pendant 5 à 15 minutes à température ambiante. Une neutralisation de l'acidité n'est pas nécessaire avant ensemencement ;
- traitement par la chaleur : chauffer le prélèvement 30 minutes à 50 °C. Cependant, la culture de certaines souches de *Legionella* peut être partiellement inhibée ;
- association des traitements acide et thermique.

Milieux de culture

La culture de *Legionella* nécessite des milieux riches répondant aux exigences culturales de la bactérie. Le milieu de base est la gélose BCYE (*buffered charcoal yeast extract*) contenant de l'extrait de levure, de la cystéine, du pyrophosphate de fer et du charbon. Ce milieu complémenté par 0,1 % d'alpha-cétoglutarate (BCYEα) et tamponné à 6,9 par du tampon ACES constitue le milieu de choix pour la culture de *Legionella*.

Cette gélose peut être rendue plus sélective par l'ajout d'antibiotiques et/ou d'antifongiques permettant d'inhiber la croissance d'une flore interférente. Il existe trois milieux dérivés du BCYE et commercialisés actuellement : milieu BMPA (milieu BCYE additionné de céfamandole, polymyxine B et anisomycine), milieu GVPC (milieu BCYE additionné de glycine, alpha-cétoglutarate, vancomycine, cycloheximide et polymyxine B) et milieu MWY (milieu BCYE additionné de glycine, polymyxine B, anisomycine et vancomycine).

Il est recommandé par le Centre national de référence (CNR) des légionelles d'ensemencer au moins deux milieux gélosés pour permettre l'isolement de *Legionella* spp. à partir de prélèvements respiratoires. L'association des milieux BMPA et MWY semble la plus performante. En cas de suspicion de *Legionella* non-*pneumophila*, il est recommandé d'ensemencer une gélose BCYE supplémentaire. En effet, certaines légionelles (par exemple *L. longbeachae*, *L. micdadei* et *L. bozemanii*) peuvent être inhibées par certains antibiotiques comme le céfamandole ou la vancomycine. Le milieu GVPC a été développé pour la culture des prélèvements d'eau et présente une moins bonne fertilité pour les légionelles. Ce milieu n'est pas recommandé pour la culture des échantillons cliniques. Si seul un milieu gélosé peut être ensemencé, il est recommandé de choisir entre le milieu BMPA et MWY.

Ensemencement et incubation des géloses

En pratique, il est recommandé d'ensemencer les géloses par 100 µl de prélèvement puis de réaliser un étalement « au râteau » (groupe Rémic 2015).

Les géloses doivent être incubées à 35 °C, en atmosphère aérobie ou sous 2,5 % de CO_2. Une atmosphère à 5 % de CO_2 inhibe la croissance des légionelles. Les cultures seront examinées à 3 jours, 5 jours et 10 jours après l'ensemencement. Si une contamination par de la flore est observée lors des premières lectures, le prélèvement peut être traité par acidification et/ou chauffage comme décrit précédemment avant d'être réensemencé.

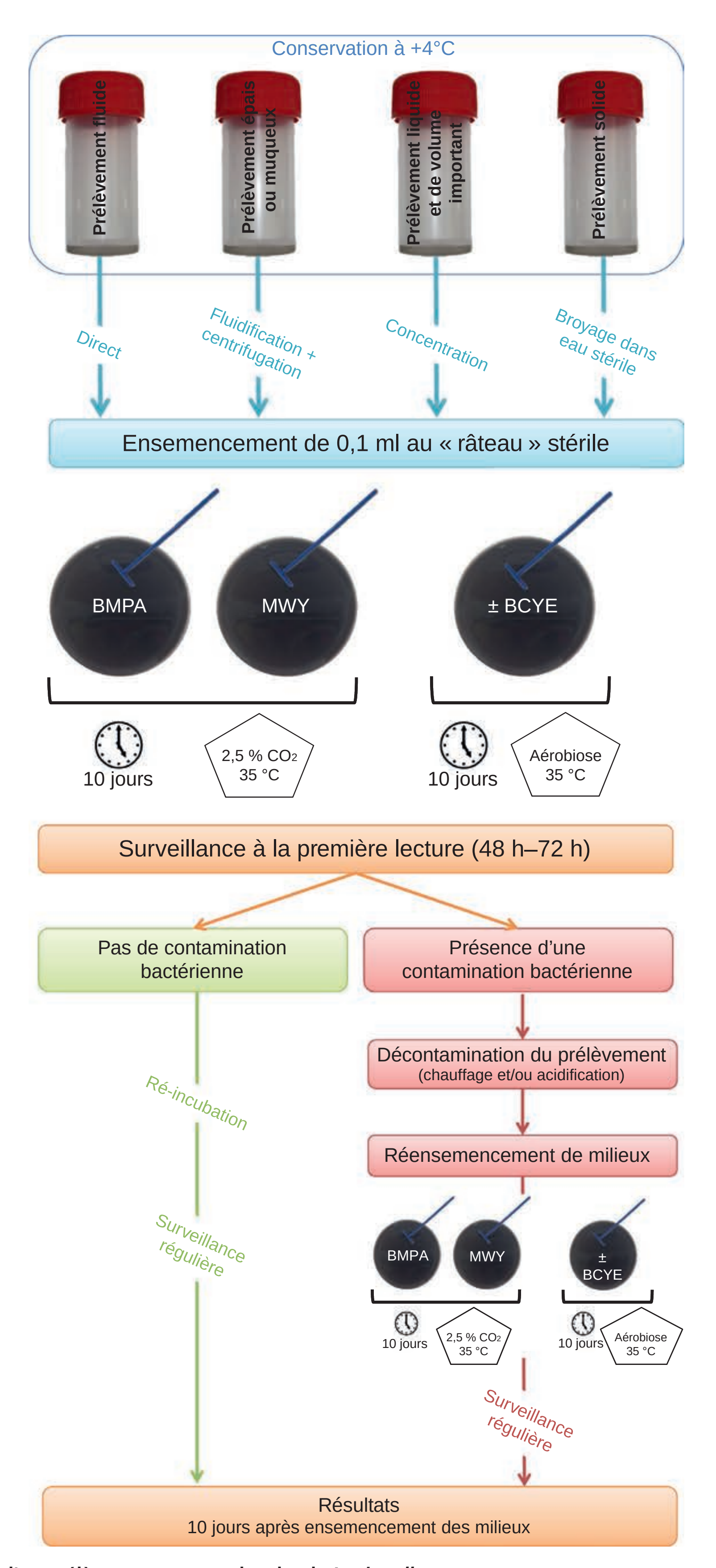


Fig. 30.39 **Mise en culture d'un prélèvement pour recherche de *Legionella*.**

Identification des colonies

Des tests immunologiques, moléculaires ou utilisant la composition protéique de la bactérie (spectrométrie de masse) seront alors utilisés pour confirmer l'appartenance au genre *Legionella* et identifier l'espèce et/ou le sérogroupe (Fig. 30.40).

Caractéristiques des colonies

Les colonies de *Legionella* apparaissent en primoculture en général dans un délai de 72 heures. Les colonies de *Legionella* sont petites, avec un aspect translucide typique dit en « verre fritté » lors de l'observation à la loupe binoculaire (grossissement ×30) (Fig. 30.41). Certaines espèces peuvent présenter une fluorescence sous lampe de Wood ; c'est le cas d'une dizaine d'espèces, comme notamment *L. anisa* ou *L. bozemanii* (Fig. 30.42 et 30.43).

Les colonies suspectes doivent être prélevées et réensemencées sur BCYE avec et sans cystéine et/ou sur gélose au sang. Une croissance sur milieu avec cystéine (BCYE, BMPA, MWY, GVPC) associée à une absence de culture sur milieu sans cystéine (BCYE sans cystéine ou gélose au sang) permettra une identification en faveur d'une *Legionella*.

Caractéristiques antigéniques

L'identification pourra être réalisée par des techniques d'agglutination de particules de latex sensibilisées ou par immunofluorescence. Les tests commercialisés permettent de détecter par des anticorps polyvalents 14 ou 15 sérogroupes de l'espèce

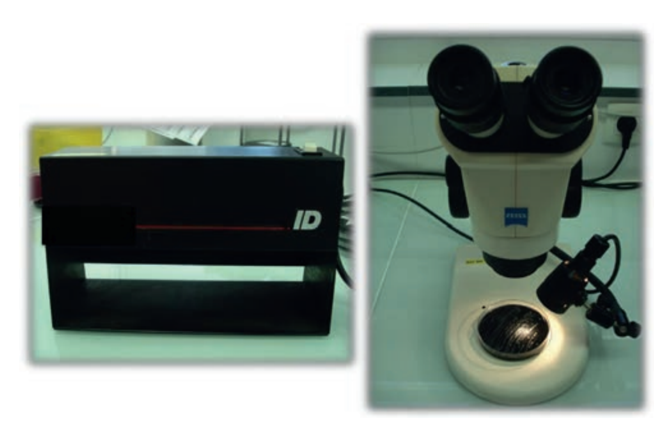


Fig. 30.41 Matériel nécessaire pour l'observation des cultures de *Legionella* : lampe de Wood (à gauche), loupe binoculaire (à droite).

Colonies suspectes en culture (BCYEα, BMPA, MWY, GVPC, etc.)
Aspect en verre fritté à la loupe binoculaire
Repiquage sur milieu BCYEα, et BCYE sans cystéine ou gélose sang
Pousse sur milieu déficient en cystéine
OUI → N'appartient pas au genre *Legionella*
NON → Suspicion de *Legionella*
Pas de fluorescence sous lampe de Wood
Fluorescence bleue sous lampe de Wood (suspicion de : *L. parisiensis, L. lytica, L. tucsonensis, L. cherrii, L. gormanii, L. bozemanii, L. steigerwaltii, L. gratiana, L. brunensis, L. dumoffii* ou *L. anisa*)
Colonies rouges (suspicion de *L. erythra, L. rubrilucens* ou *L. taurinensis)*
Suspicion de *L. pneumophila*
Agglutination au latex/IF
*Lp*1
Lp non-1
Legionella spp.
Détermination du sérogroupe par IF
MALDI-TOF-MS
Espèce de *Legionella* référencée dans la base de données
NON → Séquençage du gène *mip*
OUI
Séquençage du gène *mip*
Identification

Légende : Techniques accessibles à la majorité des laboratoires | Techniques réalisées en laboratoire spécialisé

Fig. 30.40 Identification des colonies de *Legionella*. En rouge sont représentées les techniques accessibles à la majorité des laboratoires ; en bleu sont représentées des techniques utilisées en laboratoire spécialisé ou au CNR des légionelles.

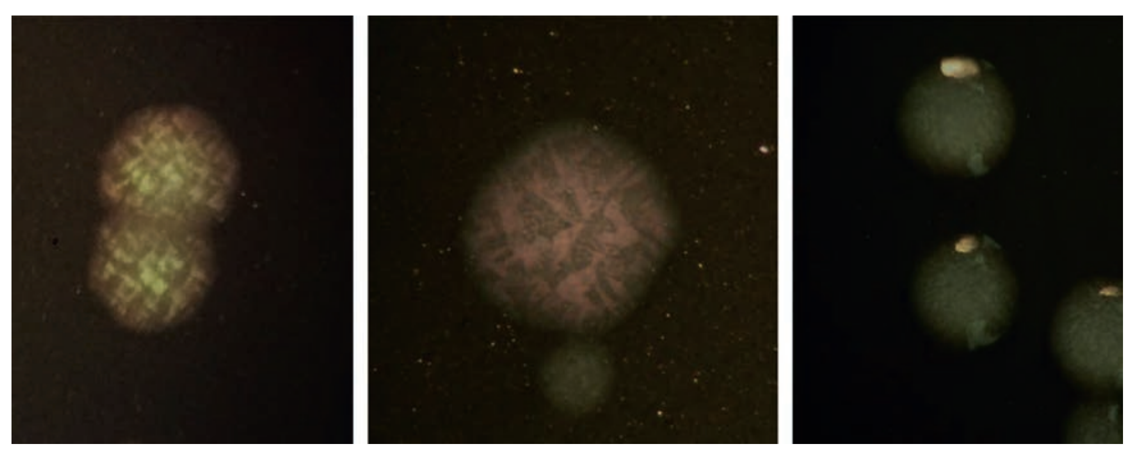


Fig. 30.42 **Aspect des colonies de *Legionella* à la loupe binoculaire (grossissement ×30) : aspect typique en « verre fritté ».**

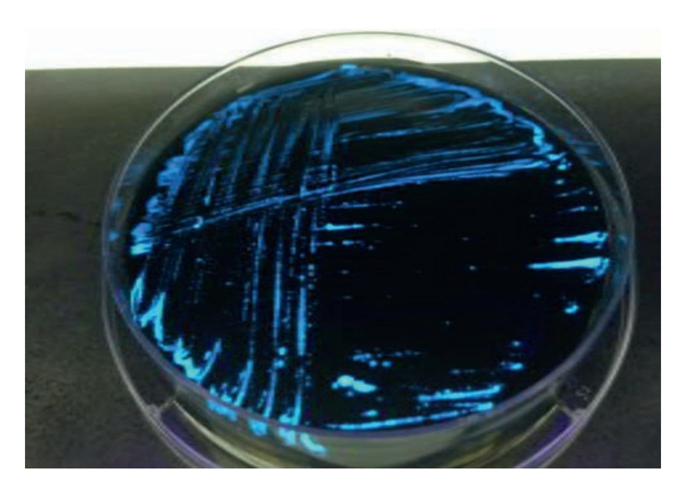


Fig. 30.43 **Observation de la fluorescence de colonies de *Legionella anisa* sous lampe de Wood.**

L. pneumophila et de différencier le sérogroupe 1 des autres sérogroupes pour certains tests. Aucun réactif ne permet l'identification du 16e sérogroupe de *L. pneumophila* (Jena-1) décrit en 1995. Certains réactifs permettant l'identification de chaque sérogroupe de *L. pneumophila* sont toutefois commercialement disponibles. Le CNR utilise le panel d'anticorps monoclonaux de Dresden de référence au niveau européen. Concernant les espèces autres que *L. pneumophila*, huit sont détectées par des anticorps polyvalents par des trousses commercialisées (*L. bozemanii*, *L. erythra*, *L. feeleii*, *L. hackeliae*, *L. longbeachae*, *L. quinlivanii*, *L. sainthelensis*, *L. spiritensis*).

Méthodes moléculaires

Des techniques de PCR couplées à du séquençage ont été développées afin de permettre l'identification des espèces autres que *L. pneumophila*. Celles-ci peuvent cibler divers gènes tels que le gène *mip*, l'ARN ribosomique 16S, l'espace intergénique 23S–5S ou encore les gènes *rpoB*, *gyrA* ou *rnpB*. La PCR ciblant le gène *mip* reste celle recommandée au niveau européen et fait l'objet d'un protocole standardisé disponible sur le site de l'European Working Group on Legionella Infections (www.www.ewgli.org). Chaque laboratoire peut soumettre ses données de séquençage sur ce même site.

Spectrométrie de masse

Des techniques d'identification des bactéries ont été récemment développées utilisant la technologie de *matrix-assisted laser desorption/ionization – time-of-flight – mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS). Cette technique, appliquée à *Legionella*, permet une identification fiable au niveau du genre et de l'espèce avec des sensibilités de 99,2 % et 89,9 % respectivement. L'identification par MALDI-TOF-MS montre une excellente corrélation avec le séquençage du gène *mip*. Néanmoins, le pouvoir discriminant varie d'une espèce à l'autre en lien avec des profils protéiques variables au sein d'une même espèce, et dépend du nombre de spectres répertoriés dans la base de données utilisée pour l'identification. La technologie de MALDI-TOF-MS n'est pas assez discriminante pour permettre de différencier les différents sérogroupes de *L. pneumophila*.

Envoi au CNR des légionelles

Il est recommandé d'envoyer toutes les souches isolées de prélèvements de patients au CNR (Lyon) pour typage (circulaire du 11 juillet 2005), et si besoin identification précise et détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Au niveau du CNR, une souche de *Legionella* spp. est identifiée notamment par MALDI-TOF-MS ou séquençage du gène *mip* ou de la séquence intergénique 23S–5S. Dans le cas de *L. pneumophila*, l'identification du sérogroupe sera réalisée par IF ou ELISA à l'aide des anticorps monoclonaux de Dresden. Pour le typage des souches dans le cadre des investigations à la recherche de la source de contamination ou de cas groupés, le *whole genome sequencing* va progressivement remplacer les trois techniques utilisées en routine jusqu'alors qui sont le typage phénotypique des Lp1 par anticorps monoclonaux, l'analyse du profil de macrorestriction de l'ADN génomique et le *sequence-based typing* (SBT).

Dans le cas d'un antigène urinaire positif et/ou d'une forte suspicion de légionellose, le prélèvement pulmonaire lui-même peut également être envoyé au CNR pour mise en culture conventionnelle ou co-culture amibienne et pour typage par *nested-SBT* (typage par SBT directement sur prélèvement, technique réalisée en deuxième intention si la culture reste négative). Cet envoi pourra également être

demandé par l'Agence régionale de santé (ARS) dans le cadre d'investigations épidémiologiques.

Détermination de la sensibilité aux antibiotiques et traitement

La réalisation d'antibiogramme sur une souche de *Legionella* n'est pas recommandée en systématique car l'acquisition de résistance aux antibiotiques par des souches cliniques ou environnementales reste exceptionnelle. Une seule souche résistante à la ciprofloxacine a été décrite à ce jour et la sélection possible in vivo de *Legionella* résistante aux fluoroquinolones au cours du traitement est de description très récente. Cependant, si l'évolution du patient est défavorable malgré une antibiothérapie adaptée, la souche ou le prélèvement doit être adressé au CNR afin de réaliser un antibiogramme en milieu liquide ou des PCR spécifiques ciblant les mutations décrites pour des clones sélectionnés expérimentalement in vitro comme associées à la résistance aux macrolides, aux fluoroquinolones ou à la rifampicine.

Le choix d'une antibiothérapie est fondé sur la sévérité de la légionellose et du terrain sous-jacent (contre-indications à certains antibiotiques). Ainsi, les macrolides, traitement historique de la légionellose, sont recommandés en monothérapie pour les formes d'intensité légère à modérée. Pour les formes graves ou chez les sujets immunodéprimés, une fluoroquinolone en monothérapie pourra être utilisée, ou une association de ces deux familles entre elles ou avec de la rifampicine peut être mise en place. Néanmoins, aucune étude n'a à ce jour montré le bénéfice de ces associations d'antibiotiques ni en termes d'efficacité, ni en termes de diminution de la mortalité (recommandations AFSSAPS 2011).

Coculture amibienne

Une coculture amibienne peut être réalisée au CNR en cas de culture conventionnelle négative. Cette technique utilise les capacités de *Legionella* à se multiplier dans les amibes telles que *Acanthamoeba castellanii*, hôtes naturels de la bactérie dans l'environnement. L'intérêt réside principalement dans la décontamination de prélèvements fortement contaminés par de la flore oropharyngée. Bien que la sensibilité de cette technique soit inférieure à la culture conventionnelle, l'association des deux techniques permet d'augmenter les chances d'isolement de *Legionella*.

Diagnostic sérologique

La sérologie présente un intérêt très limité dans le diagnostic des légionelloses. Son principal intérêt est de pouvoir détecter des réponses anticorps spécifiques pour l'ensemble des sérogroupes de *Legionella* permettant d'identifier le sérogroupe en cause, et potentiellement pour toutes les espèces de *Legionella*. Cependant, ce diagnostic ne peut être que rétrospectif, en lien avec la cinétique d'apparition des anticorps et n'aura souvent pas d'impact majeur sur la décision médicale. Deux sérums au minimum doivent être prélevés, le second sérum 2 à 3 semaines voire 5 semaines après le début de la maladie (groupe Rémic 2015). La disparition de ces anticorps est très variable d'un patient à l'autre, allant de 2 à 3 mois à 18 mois voire plus. De nombreuses réactions croisées peuvent être observées avec d'autres espèces bactériennes (*Pseudomonas* spp., *Campylobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp.), mais également entre différentes espèces et/ou différents sérogroupes de *Legionella*.

La cinétique des IgM et des IgG étant assez parallèle, il n'y a pas lieu de les doser de manière indépendante, mais au contraire il faut réaliser une recherche couplée IgG–IgM afin d'augmenter la sensibilité de la technique. Des réactifs commercialisés, fondés sur des techniques ELISA ou d'immunofluorescence indirecte (IFI), permettent la détection et le titrage des anticorps dirigés contre le lipopolysaccharide (LPS) de *Legionella*. La technique ELISA, présentant une assez bonne sensibilité, est largement utilisée comme méthode de *screening* et montre une bonne corrélation avec les techniques d'IFI. Un résultat positif par ELISA devra toutefois être confirmé par IFI, technique plus spécifique, et afin d'être en adéquation avec les critères de définition de cas de légionellose. De plus, les réactifs commercialisés se limitent le plus souvent aux sérogroupes de *L. pneumophila* 1 à 7.

En conclusion, l'utilisation de la sérologie sera majoritairement limitée aux cas de forte suspicion de légionellose avec antigène urinaire négatif et en cas d'impossibilité d'obtenir un prélèvement pulmonaire du patient.

Surveillance

La légionellose est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1987. Cette déclaration doit être réalisée par le médecin et par le biologiste selon les critères définis par l'ARS. La surveillance de la légionellose en France est fondée sur un système interactif entre l'InVS, les ARS et le CNR des légionelles. Au niveau européen, l'ECDC coordonne la surveillance de la maladie, portant une attention particulière aux cas de légionellose liés au voyage.

Dans le cas d'investigation environnementale, l'ARS ainsi que l'InVS coordonnent le recueil de prélèvements environnementaux et l'envoi des souches d'origine clinique et environnementale au CNR dans le but de comparer les souches cliniques et les souches environnementales.

Pour en savoir plus

Bruin JP, Koshkolda T, IJzerman EPF, et al. Isolation of ciprofloxacin-resistant Legionella pneumophila in a patient with severe pneumonia. J Antimicrob Chemother 2014 ; 69 : 2869–71.

Chidiac C, Che D, Pires-Cronenberger S, et al. Factors associated with hospital mortality in community-acquired legionellosis in France. Eur Respir J 2012 ; 39 : 963–70.

Den Boer JW, Yzerman EPF. Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol 2004 ; 23 : 871–8.

Descours G, Cassier P, Forey F, et al. Evaluation of BMPA, MWY, GVPC and BCYE media for the isolation of Legionella species from respiratory samples. J Microbiol Methods 2014 ; 98 : 119–21.

Descours G, Tellini C, Flamens C, et al. Legionellosis and lung abscesses : contribution of Legionella quantitative real-time PCR to an adapted followup. Case Rep Infect Dis 2013 ; 2013 : 190183.

Diederen BMW. Legionella spp. and Legionnaires' disease. J Infect 2008 ; 56 : 1–12.

Doebbeling BN, Wenzel RP. The epidemiology of Legionella pneumophila infections. Semin Respir Infect 1987 ; 2 : 206–21.

Haroon A, Koide M, Higa F, et al. Identification of Legionella pneumophila serogroups and other Legionella species by mip gene sequencing. J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother 2012 ; 18 : 276–81.

Helbig J, Bernander S, Pastoris MC, et al. Pan-European study on culture-proven legionnaires' disease : distribution of Legionella pneumophila serogroups and monoclonal subgroups. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002 ; 21(10) : 710–6.

Kohler RB, Winn WC, Wheat LJ. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease. J Clin Microbiol 1984 ; 20 : 605–7.

Koide M, Higa F, Tateyama M, et al. Detection of Legionella species in clinical samples : comparison of polymerase chain reaction and urinary antigen detection kits. Infection 2006 ; 34 : 264–8.

Moliner C, Ginevra C, Jarraud S, et al. Rapid identification of Legionella species by mass spectrometry. J Med Microbiol 2010 ; 59(Pt 3) : 273–84.

Sire S, Staub T, Christmann D. Manifestations extra-pulmonaires des légionelloses. Médecine Mal Infect 1994 ; 24 : 874–80.

Whiley H, Bentham R. Legionella longbeachae and legionellosis. Emerg Infect Dis 2011 ; 17 : 579–83.

Yang G, Benson R, Pelish T, et al. Dual detection of Legionella pneumophila and Legionella species by real-time PCR targeting the 23S-5S rRNA gene spacer region. Clin Microbiol Infect 2010 ; 16 : 255–61.

Quelques textes de références

Circulaire DGS/SD7A/SD5C-DHOS/E4 n° 2002/243 du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé.

Circulaire DGS/SD7A/DHOS/E4/DGAS/SD2 n° 2005-493 du 28 octobre 2005 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements sociaux et médico-sociaux d'hébergement pour personnes âgées.

Le risque lié aux légionelles : guide d'investigation et d'aide à la gestion. HCSP ; 2013.

Adresse utile

Centre national de référence *Legionella*
Dr Sophie Jarraud, Pr Gérard Lina
Groupement Hospitalier Est
59, boulevard Pinel, 69677 Bron cedex
Tél : 04 72 12 96 25 – Fax : 04 72 35 73 35
E-mail : sophie.jarraud@chu-lyon.fr
Site : http://cnr-legionelles.univ-lyon1.fr

Bacilles à Gram négatif microaérophiles

C. Burucoa

PLAN DU CHAPITRE

31.1 *Campylobacter*

C. Burucoa

Généralités

Les *Campylobacter* sont des bacilles à Gram négatif qui apparaissent incurvés, spiralés ou sous forme hélicoïdale dont l'épaisseur varie de 0,2 à 0,9 µm et la longueur de 0,5 à 5 µm (Fig. 31.1 et 31.2).

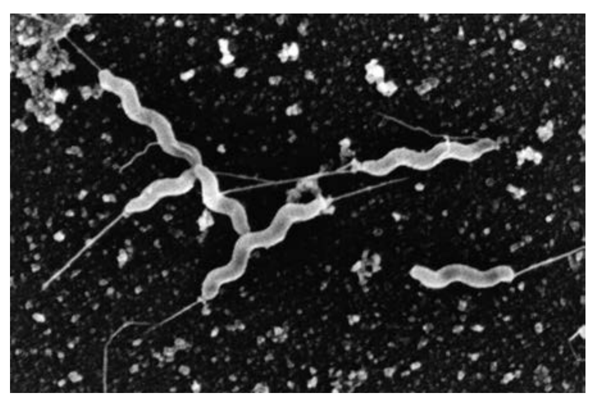


Fig. 31.1 Vue en microscopie électronique à balayage de *C. jejuni*. *(Cliché : service d'anatomopathologie, CHU Poitiers.)*

Les *Campylobacter* sont considérés comme étant la principale cause bactérienne de gastro-entérites dans le monde avec une incidence croissante dans les pays développés.

Les *Campylobacter* ont été individualisés en 1963 par leur GC % (29 à 38 %) très inférieur à celui des *Vibrio* (40 à 52 %) par Sébald et Véron qui ont proposé ce genre nouveau. *Campylobacter* vient du grec λκαμπϑλοσ, incurvé ; βαχτερ, bâtonnet.

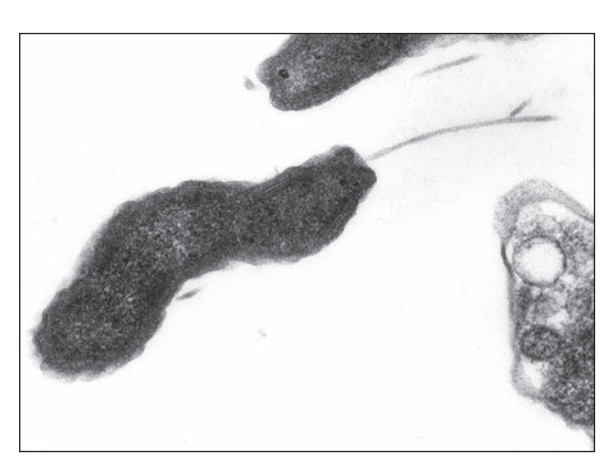


Fig. 31.2 Coupe de *C. jejuni* en microscopie électronique à transmission. *(Cliché : service d'anatomopathologie, CHU Poitiers.)*

Le genre *Campylobacter* contient 45 espèces dont les principales sont *C. jejuni* et *C. coli*, responsables d'entérites, et *C. fetus*, responsable de septicémies chez l'immunodéprimé.

Ce genre appartient à la superfamille VI de bacilles à Gram négatif, actuellement dénommée classe des *Epsilonproteobacteria*, qui comprend quatre genres : *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* et *Wolinella*. Les deux premiers genres ont été regroupés dans la famille des *Campylobacteraceae*.

Au sein de cette famille, on a décrit dans le genre *Campylobacter* une espèce type *C. fetus* et 16 autres espèces ainsi que plusieurs sous-espèces (Tableau 31.1).

Les espèces du genre *Campylobacter* sont principalement responsables de zoonoses avec de nombreuses espèces animales impliquées comme réservoirs infectieux.

La classification de ces espèces sur une base morphologique et physiologique est relativement difficile car les caractères distinctifs sont peu nombreux. Traditionnellement, ces espèces sont cependant divisées en deux groupes, selon qu'elles produisent ou non une catalase. Le fondement génétique de cette division phénotypique simple a été confirmé par de nombreuses études génétiques.

Tableau 31.1 **Les espèces du genre *Campylobacter* et leurs hôtes préférentiels.**

Espèces et sous-espèces	Hôtes préférentiels
Campylobacter jejuni subsp. *jejuni*	Oiseaux, humains, bovins, ovins, chats, chiens
Campylobacter jejuni subsp. *doylei*	Humains
Campylobacter coli	Porcins, oiseaux
Campylobacter fetus subsp. *veneralis*	Bovins, ovins
Campylobacter fetus subsp. *fetus*	Bovins, ovins
Campylobacter sputorum bv. sputorum comprend C. sputorum bv. bubulus	Humains, bovins, ovins, porcins
Campylobacter sputorum bv. paraureolyticus	Bovins, humains
Campylobacter sputorum bv. fecalis	Ovins, bovins
Campylobacter mucosalis	Porcins
Campylobacter concisus	Humains
Campylobacter lari	Oiseaux, chats, chiens
Campylobacter rectus	Humains
C. hyointestinalis subsp. *hyointestinalis*	Porcins, bovins, hamsters
C. hyointestinalis subsp. *lawsonïi*	Porcins
Campylobacter curvus	Humains
Campylobacter upsaliensis	Chats, chiens, humains
Campylobacter showae	Humains
Campylobacter helveticus	Chats, chiens
Campylobacter lanienae	Humains
Campylobacter gracilis	Humains
Campylobacter hominis	Humains
Campylobacter insulaenigrae	Mammifères marins

Épidémiologie et pouvoir pathogène

Les *Campylobacter* sont des bactéries commensales du tube digestif de nombreux oiseaux et mammifères. Les oiseaux en général, le poulet en particulier, peuvent être considérés comme le réservoir naturel de *C. jejuni*. Cette bactérie vit au niveau du cloaque des oiseaux où elle est présente à de fortes concentrations (10^6 UFC/g de matière fécale). Cette colonisation est sans conséquence pathologique chez les oiseaux. La prévalence de *Campylobacter* au niveau du tube digestif des volailles est 8 à 20 fois plus élevée que celle de *Salmonella*. Selon les études, 40 à 80 % des carcasses de poulet à la distribution sont contaminées. *C. coli* est essentiellement rencontré chez le porc, *C. upsaliensis* chez le chien, *C. lari* chez la mouette. Ces espèces bactériennes peuvent toutefois être retrouvées chez d'autres animaux d'élevage destinés à l'alimentation humaine et des animaux de compagnie.

Campylobacter peut survivre dans l'environnement pendant plusieurs semaines à des températures proches de 4 °C, particulièrement dans l'eau ou le lait. Il ne peut se multiplier dans les aliments à la différence des *Salmonella*.

Dans les pays développés, la transmission des *Campylobacter* s'effectue selon deux modes : un mode sporadique qui représente la majorité des cas, et un mode épidémique, plus spectaculaire, mais moins fréquent.

La transmission est essentiellement d'origine alimentaire et la principale source d'infection est la consommation de viande de poulet crue ou insuffisamment cuite. Toute viande crue est susceptible d'être contaminée par *Campylobacter*, la volaille étant, de loin, la principale viande incriminée. La majorité des cas sporadiques est due à la consommation de volaille ou par contamination croisée d'aliments consommés crus.

Lors d'épidémies, d'autres sources d'infection ont été décrites ; ainsi, le lait cru consommé par des collectivités d'enfants et les réservoirs d'eau potable notamment sont les sources les plus souvent incriminées. La contamination par l'eau de boisson explique la saisonnalité estivale des épidémies.

Infection à *Campylobacter jejuni*

Les manifestations cliniques d'une infection entérique à *Campylobacter* sont identiques quelle que soit l'espèce de *Campylobacter*. *C. jejuni* en est le prototype.

L'entérite à *Campylobacter* survient préférentiellement chez les enfants de moins de 5 ans sous forme d'une diarrhée aiguë. La période d'incubation estimée est de 1 à 10 jours. L'entérite débute par une phase prodromique de 2 jours, associant fièvre élevée et frissons, puis survient la phase digestive caractérisée par des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales. La diarrhée apparaît ensuite, initialement aqueuse, puis parfois muqueuse, sanglante ou purulente. Ce syndrome dysentérique n'est pas distinguable de celui provoqué par *Shigella* et *Salmonella*.

La distribution saisonnière est moins marquée que celle des *Salmonella*, bien qu'un pic estival soit observé.

L'entérite à *Campylobacter* est spontanément régressive. La durée totale de l'épisode aigu est de 8 à 10 jours, mais les patients excrètent *Campylobacter* dans leurs selles pendant plusieurs semaines voire parfois plusieurs mois après la guérison clinique. Des rechutes surviennent chez 25 % des patients, souvent limitées à des crises abdominales douloureuses.

Parmi les *Campylobacter*, l'espèce *C. jejuni* est la plus fréquemment isolée au laboratoire de biologie médicale (82 % des souches), suivie de *C. coli* (15 %) puis de *C. fetus* (4 %, dont 65 % isolé d'hémocultures). *Arcobacter butzleri* représente 1 % des *Campylobacteraceae* identifiés par le Centre national de référence (CNR, données 2013).

En France, on estime à près de 18 000 le nombre de cas annuels d'entérites à *Campylobacter* confirmés et près de 3000 hospitalisations seraient imputables à ces germes.

Les bactériémies et les septicémies sont très rares lors des infections dues à *C. jejuni*, la plupart des souches étant sensibles à l'activité bactéricide non spécifique du sérum.

Un pour cent des malades développe une arthrite réactionnelle aseptique 7 à 10 jours après l'épisode diarrhéique.

Plus grave mais rare (1 à 3 cas pour 1000 infections), le syndrome de Guillain-Barré (polyradiculonévrite ascendante régressive postinfectieuse) peut entraîner des troubles de la déglutition, voire des paralysies des muscles respiratoires nécessitant alors une ventilation artificielle en réanimation. Il est dû à une maladie démyélinisante aiguë des nerfs périphériques. L'infection à *C. jejuni* est l'une des causes principales du syndrome de Guillain-Barré dans les pays développés. L'apparition des premiers signes neurologiques survient 1 à 3 semaines après l'infection à *C. jejuni*.

Les malades atteints de ce syndrome présentent des traces sérologiques d'infection à *C. jejuni* dans 20 à 40 % des cas. Aux États-Unis et au Japon, 30 à 80 % des souches isolées de malades atteints de ce syndrome appartiennent au sérogroupe Penner 19, Lior 7. Ce sérogroupe ne représente que 3 % des souches isolées habituellement dans ces pays. Il existe des similarités moléculaires entre les antigènes de la paroi bactérienne et les composants de la gaine de myéline des nerfs ; la structure terminale de l'oligosaccharide du LPS du sérogroupe concerné est identique à la structure terminale du ganglioside GM1 du nerf.

Infection à *Campylobacter fetus*

Contrairement à *C. jejuni*, *C. fetus* est rarement à l'origine d'entérite. Il provoque le plus souvent des syndromes fébriles prolongés compliqués d'atteintes focales touchant plus particulièrement l'endothélium vasculaire (endocardites, anévrismes de l'aorte, thrombophlébites). Les infections systémiques à *C. fetus* surviennent le plus souvent chez des malades souffrant d'une pathologie sous-jacente (cirrhose, cancer, diabète, immunosuppression, etc.).

L'infection à *C. fetus* pendant la grossesse peut se manifester par des signes respiratoires, de la fièvre, une bactériémie. L'évolution est toujours favorable pour la mère, alors que la mortalité fœtale est élevée.

C. fetus peut également être à l'origine d'infection du système nerveux central, d'arthrite septique, d'ostéomyélite, d'infection urinaire.

Infections provoquées par les autres *Campylobacter*

C. coli est à l'origine des mêmes manifestations cliniques que *C. jejuni*. L'intensité des signes cliniques est cependant moins importante.

C. upsaliensis est à rapprocher de *C. fetus*. Il peut provoquer des entérites chez les patients immunocompétents accompagnées de bactériémies chez les patients immunodéprimés.

C. lari peut provoquer des diarrhées aiguës chez l'enfant et des bactériémies chez l'adulte immunodéprimé.

C. hyointestinalis peut être responsable de diarrhées hydriques chez l'enfant.

C. concisus, C. curvus, C. rectus, C. gracilis et *C. showae* ont été associés à des parodontopathies.

Physiopathologie

Seules les bases moléculaires du pouvoir pathogène de *C. jejuni* ont fait l'objet de travaux. Les autres espèces ont été peu étudiées. *C. jejuni* est capable d'adhérer et de pénétrer des cellules épithéliales en culture. Les pili, la flagelline, les protéines de membrane externe et le lipopolysaccharide (LPS) pourraient jouer le rôle d'adhésine. *C. jejuni* peut survivre à l'intérieur des vacuoles et induire l'apoptose et la production d'interleukine 8 (IL-8) médiateur de l'inflammation. *C. jejuni* peut transloquer par voie trans- ou paracellulaire. Enfin, *C. jejuni* produit une toxine distendant le cytosquelette.

C. fetus possède une microcapsule S qui le rend résistant à la phagocytose.

Diagnostic

Le diagnostic est le plus souvent direct, reposant sur l'isolement de *Campylobacter* à partir des selles ou sur la détection de son ADN par PCR.

Diagnostic bactériologique direct

Prélèvement

La recherche de *Campylobacter* doit être systématique et faire partie intégrante des coprocultures devant une diarrhée infectieuse aiguë ; elle est réalisable sur un échantillon de selles ou sur le produit d'un écouvillonnage rectal. L'écouvillon doit être ensemencé immédiatement ou stocké en milieu de transport (Cary-Blair 1,6 % agar, 4 °C) car les *Campylobacter* sont sensibles à la dessiccation.

La découverte de *Campylobacter* dans les hémocultures est le plus souvent le fruit du hasard. Il faut néanmoins savoir y penser devant des cultures négatives et utiliser alors des milieux de culture adéquats.

Examen direct

L'observation au microscope à contraste de phase permet de mettre en évidence les *Campylobacter* grâce à leur mobilité caractéristique en « vol de moucherons », proche de ce que l'on observe avec *Vibrio cholerae.* Un frottis coloré peut permettre à un observateur exercé de noter la présence de bactéries incurvées (voir Fig. 31.1 et 31.2), de petite taille (0,2 à 0,9 µm × 0,5 à 5 µm), souvent associée à la présence d'hématies et de leucocytes. Malheureusement, l'examen direct des selles est une étape trop souvent négligée lors des examens de routine.

Recherche d'antigènes spécifiques de *Campylobacter* dans les selles

Plusieurs trousses de détection d'antigènes spécifiques de *Campylobacter* dans les selles ont été récemment mises sur le marché. Deux mettent en œuvre une réaction immuno-enzymatique par ELISA en plaque de 96 puits (Premier Campy®, Meridian et Ridascreen Campylobacter®, R-Biopharm), peu pratique si on reçoit moins de 96 selles par jour. Un test unitaire immunochromatographique (immunoCard Stat ! Campy®, Méridian) répond mieux à un volume moindre d'examens mais pour des performances moindres.

Détection PCR

Plusieurs trousses sont maintenant commercialisées pour détecter *Campylobacter* dans les selles par PCR temps réel. Certaines permettent une approche syndromique avec la détection de nombreux bactéries, virus et parasites. Elles distinguent *C. jejuni* de *C. coli* et pourraient être utilisées dans des stratégies de screening où la culture ne serait réalisée qu'en cas de détection.

Milieux de culture

Rappelons que les *Campylobacter* sont microaérophiles, chimio-organotrophes, utilisant les acides aminés et les acides organiques comme source de carbone mais jamais les sucres. Ils possèdent tous une oxydase, mais la catalase est variable selon les espèces.

L'échantillon de selles doit être mis en culture sur des milieux contenant du sang (Skirrow, Butzler, Blaser, Campylosel, Preston) ou du charbon (Karmali, mCCD, CAT) et rendus sélectifs par l'addition d'antibiotiques inhibant la croissance des autres bactéries. En général, deux à trois antibiotiques parmi les suivants sont utilisés : triméthoprime, polymyxine, vancomycine, colistine, bacitracine, amphotéricine B, céfalotine, céfopérazone, rifampicine, actidione. Des milieux prêts à l'emploi sont commercialisés (Campylosel®). Des milieux non sélectifs peuvent être utilisés, à condition de filtrer au préalable l'échantillon de selles sur une membrane à pores de 0,65 µm qui retient la plupart des bactéries, mais qui laisse passer les *Campylobacter* en raison de leur petite taille et de leur mobilité. La combinaison de ces deux techniques, filtration et sélection, augmente la sensibilité de l'isolement.

Les milieux sont incubés au moins 48 heures en atmosphère microaérobie, de préférence à 37 °C pour ne pas inhiber la croissance des espèces thermosensibles (bien que la majorité des souches de *Campylobacter* entéropathogènes soient thermorésistantes et croissent à 41 °C). L'atmosphère microaérobie est obtenue en jarre étanche à l'aide de générateurs chimiques de gaz exempts d'hydrogène et consommant une partie de l'oxygène de l'enceinte (Campygen®, Oxoid). Une incubation prolongée de 5 à 8 jours est parfois nécessaire.

Diagnostic d'espèce

Les spectromètres de masse MALDI-TOF, largement répandus dans les laboratoires de bactériologie, sont très performants pour identifier les différentes espèces de *Campylobacter*. En l'absence de MALDI-TOF, l'identification au niveau du genre *Campylobacter* est facile ; elle repose sur les exigences culturales, la microaérobiose, la morphologie incurvée, la coloration Gram négatif et la présence d'une oxydase.

Sans MALDI-TOF, l'identification au niveau de l'espèce nécessite des tests complémentaires. Des tests phénotypiques fondés sur la température de croissance et la sensibilité à l'acide nalidixique et à la céfalotine ont été proposés depuis longtemps pour l'identification des principales espèces d'intérêt médical (Tableau 31.2), mais le faible pouvoir discriminant des tests fondés sur la température de croissance et les modifications des tests de sensibilité aux antibiotiques du fait de l'acquisition de plus en plus fréquente des résistances à ces antibiotiques rendent désormais peu fiables ces marqueurs diagnostiques.

En pratique occasionnelle d'isolement de *Campylobacter*, les conditions de température de croissance sont difficiles à apprécier, et la sensibilité à l'acide nalidixique qui devrait permettre la distinction entre *C. fetus* (naturellement résistant) et *C. jejuni* et *C. coli* (naturellement sensibles) est fortement perturbée par la fréquence élevée de la résistance aux quinolones de ces espèces (40 %).

La recherche d'une activité catalasique est facile à réaliser. Encore largement répandue et peu chère, elle permet de distinguer deux groupes de *Campylobacter* :

- les *Campylobacter* catalase positive (*C. jejuni*, *C. lari*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis* et *C. upsaliensis*) ;
- les *Campylobacter* très sensibles à l'oxygène qui sont catalase négative (*C. sputorum*, *C. mucosalis*, *C. concisus*, *C. rectus* et *C. curvus*). Mais les membres de ce groupe sont très rarement isolés en pratique médicale humaine.

C. coli ne se distingue de *C. jejuni* que par son inaptitude à hydrolyser l'hippurate. La détection de l'hydrolyse de l'hippurate par la méthode de Harvey (Encadré 31.1) nécessite l'utilisation de substrats de préparation récente (particulièrement la ninhydrine) et une culture abondante qui oblige souvent à subcultiver l'isolement. De plus, des réactions faussement négatives et des souches de *C. jejuni* hippurate négatives ont été décrites.

Si on dispose d'un spectromètre de masse MALDI-TOF, et vu le très faible coût d'une identification, il est recommandé de tester même les colonies d'aspect peu typique qui poussent sur le milieux sélectif. Cette stratégie permet d'augmenter la sensibilité de détection de *Campylobacter*.

Tableau 31.2 **Caractères d'identification des différentes espèces de *Campylobacter*.**

	Cat.	Croissance		Ind.	Uréase	Hip.	Céf.	Nal.	Nit.	H_2S
		25 °C	42 °C	*acét.*						*TSI*
Campylobacter jejuni subsp. *jejuni*	+	–	+	+	–	+	R	S*	+	–
Campylobacter jejuni subsp.*doylei*	+f/–	–	–	V	–	v	S	S	–	–
Campylobacter coli	+	–	+	+	–	–	R	S	+	+f
Campylobacter fetus subsp. *veneralis*	+	+	–	–	–	–	S	R	+	–
Campylobacter fetus subsp. *fetus*	+	+	–	–	–	–	S	R	+	–
Campylobacter sputorum bv. *sputorum*	–	–	+	–	–	–	S	S	+	+
C. sputorum bv. *paraureolyticus*	–	–	+	–	+	–	S	S	+	+
C. sputorum bv. *fecalis*	+	–	+	–	–	–	S	S	V	+
Campylobacter mucosalis	–	–	+	–	–	–	S	R	+	+
Campylobacter concisus	–	–	+	–	–	–	R	R	+	+
Campylobacter lari	+	–	+	–	v	–	R	R	+	–
Campylobacter rectus	–	–	+	+	–	–	nd	S	+	+
C. hyointestinalis subsp. *hyointestinalis*	+	–	+	–	–	–	S	R	+	+
C. hyointestinalis subsp. *lawsonii*	+	–	+	–	–	–	S	R	+	+
Campylobacter curvus	–	–	+	+	–	–	nd	S	+	+
Campylobacter upsaliensis	+f	–	+	+	–	–	S	S	+	–
Campylobacter showae	+	–	v	V	–	–	S	S	+	v
Campylobacter helveticus	–	–	+	+	–	–	S	S	+	–
Camplylobacter lanienae	+	–	+	–	–	–	nd	R	+	–
Campylobacter gracilis	–	–	+	+	–	–	nd	v	+	–

* 30 % des souches sont résistantes à l'acide nalidixique.

Cat : catalase ; Ind. acét. : indoxyl acétate estérase ; Hip. : hippurate ; Céf. : céfalotine ; Nal. : acide nalidixique ; Nit. ; nitrite réductase ; H_2S TSI : production d'H_2S en milieu TSI ; S : sensible ; R : résistant ; v : variable ; nd : non déterminé ; f : faible.

Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme est toujours indiqué en raison de la fréquence élevée de la résistance aux antibiotiques utilisés. On testera en priorité les fluoroquinolones (ciprofloxacine), macrolides (érythromycine), aminosides (gentamicine) et β-lactamines (ampicilline et amoxicilline–acide clavulanique). La réalisation technique et l'interprétation de l'antibiogramme de *Campylobacter* suivent les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie harmonisées par l'EUCAST (CA-SFM/EUCAST 2015). À partir d'une culture de 18 à 24 heures sur milieux d'isolement, un inoculum standardisé à 0,5 McFarland (10^8 UFC/ml) est préparé en bouillon *Brucella* ou en solution saline (0,9 % NaCl), ensemencé par

Encadré 31.1 **Hydrolyse de l'hippurate par la méthode de Harvey**

Substrat

Hippurate de Na : 1 g
Tampon phosphate : 100 ml
Pour le tampon :
- 73,2 ml d'une solution à 9,07 g/l de KH_2 PO_4
- 26,8 ml d'une solution à 11,87 g/l de Na_2 H PO_4

Filtrer sur membrane 0,45 µ
Répartir à raison de 0,5 ml dans les tubes à hémolyse

Exécution de la réaction

Faire une suspension bactérienne laiteuse dans le substrat
Incuber à 37 °C pendant 2 heures
Ajouter 0,2 ml d'une solution à 3,5 % de ninhydrine dans l'acétone/butanol 1:1
Incuber 10 minutes à 37 °C : si apparition d'une couleur violette, la réaction est positive

écouvillonnage ou par inondation sur une gélose de MH-F. La lecture des diamètres d'inhibition est réalisée après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C en atmosphère microaérobie. Les fréquences de résistances sont de 2,6 % pour les macrolides, 53 % pour la tétracycline, 55 % pour les fluoroquinolones et 33 % pour l'ampicilline. La résistance à l'amoxicilline–acide clavulanique et aux aminosides est exceptionnelle.

Les infections systémiques à *C. fetus* peuvent être traitées par une association de gentamicine (aucune résistance décrite) avec une β-lactamine (imipénème, 14 % de résistance à l'ampicilline) ou un macrolide (1,5 % de résistance à l'érythromycine). *C. fetus* est naturellement résistant aux quinolones. Sa sensibilité aux fluoroquinolones nécessite la détermination de la CMI.

Diagnostic sérologique

La sérologie n'a pas d'intérêt dans les épisodes diarrhéiques aigus, pour lesquels l'isolement à partir des selles doit être privilégié. Lors des complications postinfectieuses observées au décours des infections intestinales, comme l'arthrite réactionnelle et le syndrome de Guillain-Barré, la sérologie permet un diagnostic rétrospectif d'infection à *Campylobacter* et apporte un élément étiologique. La réaction de fixation du complément est la plus pratiquée; elle utilise des antigènes obtenus par extraction alcaline à partir des trois espèces *C. coli, C. jejuni* et *C. fetus*.

Une méthode ELISA utilisant comme antigène un extrait acide permet la recherche différentielle des IgG, A et M. Seule la réaction de fixation du complément est inscrite à la nomenclature des actes de biologie médicale (B 60). Les réactifs pour l'effectuer sont fabriqués par Virion et distribués par AES. La réaction de fixation du complément semble être un test robuste et adapté aux rares indications de diagnostic sérologique des infections à *Campylobacter*.

L'infection à *Campylobacter* n'est pas une infection à déclaration obligatoire. Elle fait l'objet actuellement d'une surveillance par l'Institut national de veille sanitaire (InVS) et est au centre des préoccupations de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES).

Pour en savoir plus

Euzéby JP. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/campylobacter.html.

Fauchère JL. Campylobacter. In : Courvalin P, Leclerc R, Bingen E, editors. L'Antibiogramme. 2e éd Paris : ESKA ; 2006.

Rapport de l'Afssa sur l'appréciation des risques alimentaires liés aux campylobacters, application au couple poulet/*Campylobacter jejuni* www.afssa.fr/Ftp/afssa/22208-I.pdf.

Site du Centre national de référence des *Campylobacters* et *Helicobacters* : www.cnrch.u-bordeaux2.fr.

31.2 *Helicobacter pylori*

C. Burucoa

Introduction

Les *Helicobacter* sont des bacilles à Gram négatif de forme spiralée de 0,5 à 1 µm sur 2 à 4 µm (Fig. 31.3). Si la présence de bactéries spiralées dans l'estomac avait été rapportée dès le XIX[e] siècle, *H. pylori* n'a été cultivé pour la première fois qu'en 1982 par Marshal et Warren. Cette découverte a valu en 2005 le prix Nobel de médecine à ces deux chercheurs australiens.

Helicobacter pylori colonise l'estomac de la moitié de l'humanité. La prévalence de l'infection en France est estimée entre 20 et 30 % de la population. Elle est plus forte chez les personnes de bas niveau socio-économique et originaires de pays en développement. Il est responsable de nombreuses pathologies gastroduodénales de la gastrite chronique aux ulcères gastriques et duodénaux jusqu'au cancer gastrique et au lymphome du MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*).

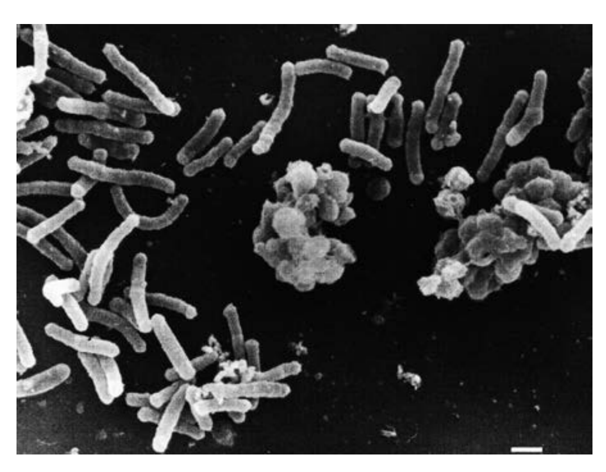


Fig. 31.3 Vue en microscopie électronique de formes bacillaires et coccoïdes d'*Helicobacter pylori*. *(Cliché : N. Quellard, B. Fernandez, service de microscopie électronique du CHU de Poitiers.)*

L'éradication de la bactérie de la muqueuse gastrique entraîne la guérison de la gastrite, des ulcères et de certains lymphomes du MALT, empêche les rechutes et prévient l'évolution vers le cancer gastrique.

La fréquence élevée des résistances aux antibiotiques (>20 % pour la clarithromycine) impose la détermination de la sensibilité aux antibiotiques avant la mise en route d'un traitement. L'isolement, la culture et l'antibiogramme d'*H. pylori* sont nécessaires pour répondre à cette indication. La PCR temps réel apporte une alternative intéressante à la culture.

Le genre *Helicobacter* appartient à la subdivision ε des *Proteobacteria*, ordre des *Campylobacterales*, famille des *Helicobacteraceae*. Cette famille comprend aussi les genres *Wolinella*, *Flexispira*, *Sulforimonas*, *Thiomicrospora* et *Thiovolum*. Les espèces du genre *Helicobacter* sont toutes microaérophiles et, dans la plupart des cas, catalase et oxydase positives. Elles colonisent la muqueuse digestive de l'homme ou d'animaux (Tableau 31.3).

Tableau 31.3 **Les différents *Helicobacter* et leurs hôtes.**

Espèce	Hôte naturel	Hôte occasionnel
Helicobacter gastriques		
H. acinonychis	Guépard	
H. bizzozeroni	Chien	
H. bovis	Bovins	
H. felis	Chat, chien	
H. heilmannii	Homme, primates, chien, chat, porc	
H. suis	Cochon	
H. mustelae	Furet	
H. nemestrinae	Macaque	
H. pylori	Homme	Primates
H. salomonis	Chien	
H. suncus	Musaraigne	
Helicobacter entérohépatiques		
H. bilis	Chien, souris	Homme
H. canis	Chien	Homme
H. cinaedi	Hamster	Homme
H. cholecystus	Hamster	
H. fennelliae	Hamster	Homme
H. hepaticus	Souris	
H. muradirum	Souris, rat	
H. canadensis	Oiseaux	
H. rodentum	Souris	
H. trogontum	Rat	
H. typhlonicus	Souris	
H. rappini	Chien, mouton	Homme

Habitat et pouvoir pathogène

L'homme est le réservoir exclusif d'*H. pylori* et les rares animaux chez qui *H. pylori* a pu être isolé sont des animaux vivant proches de l'homme et vraisemblablement contaminés à son contact (porcs, cafards, moutons, singes en captivité). La transmission est strictement interhumaine, précoce dans l'enfance et intrafamiliale.

L'estomac de l'homme est le seul site où *H. pylori* peut être isolé sous forme cultivable. La voie de transmission d'*H. pylori* d'un hôte infecté à un nouvel hôte est encore une énigme. Trois voies de transmission sont suspectées : gastro-orale, oro-orale et féco-orale. La possibilité d'une transmission féco-orale faisant intervenir la forme coccoïde, présente en grand nombre dans les selles de patients infectés et pouvant contaminer l'environnement, est encore fortement discutée.

Dans les pays industrialisés, la prévalence s'élève progressivement avec l'âge. Le taux d'infection est de 5 à 10 % chez l'enfant et atteint 20 à 50 % chez l'adulte.

L'infection à *H. pylori* provoque constamment une gastrite, le plus souvent asymptomatique, qui persiste toute la vie de l'hôte en l'absence de traitement d'éradication. Elle peut évoluer vers des pathologies plus sévères comme les ulcères gastriques ou duodénaux dans 10 % des cas, le cancer gastrique dans 1 % des cas ou, beaucoup plus rarement, le lymphome du MALT.

H. pylori est la seule bactérie responsable d'un cancer chez l'homme. L'adénocarcinome gastrique est le deuxième cancer digestif en France, avec 7000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année.

L'évolution de la gastrite vers des pathologies sévères répond à des interactions complexes entre les facteurs de virulence bactériens, des facteurs génétiques de susceptibilité individuelle de l'hôte infecté, la localisation de l'infection dans l'estomac et des facteurs environnementaux essentiellement représentés par des pratiques alimentaires (Fig. 31.4).

L'ensemble des souches cliniques d'*H. pylori* expriment des facteurs de colonisation qui lui permettent de survivre

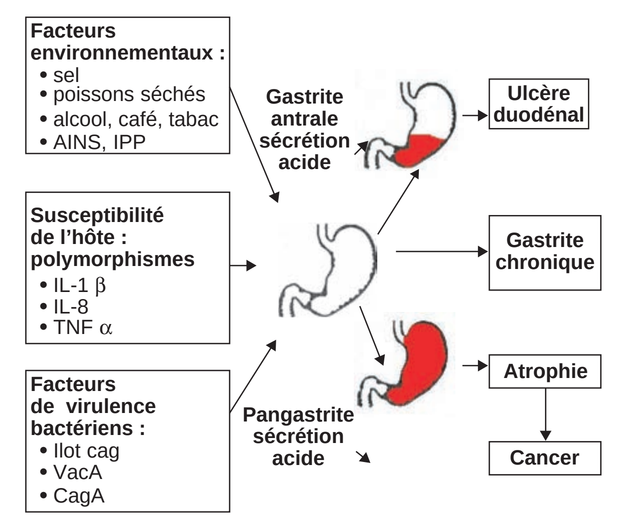


Fig. 31.4 **Déterminisme pathologique de l'infection à *Helicobacter pylori*.**

à l'acidité gastrique (uréase), de se mouvoir dans le mucus (flagelles), d'adhérer aux cellules de l'épithélium gastrique (adhésines), d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et de persister de manière chronique (leurres antigéniques, plasticité génomique). Une partie seulement des souches isolées exprime des facteurs de pathogénicité responsables de lésions plus importantes en altérant l'intégrité de la muqueuse (cytotoxine vacuolisante, VacA) ou en déclenchant puis modulant la nature de la réponse inflammatoire (îlot de pathogénicité *cag*, CagA). Les facteurs liés à l'hôte avaient été fortement suspectés par l'observation de familles gravement atteintes par le cancer gastrique. Le support génétique de cette susceptibilité serait représenté par certains polymorphismes de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire : gène de l'interleukine 8 (IL-8), de l'IL-1β et du TNFα.

Les sujets chez qui la sécrétion acide est augmentée développent une gastrite antrale qui pourra conduire à un ulcère duodénal. Les sujets chez qui la sécrétion acide est diminuée développent une pangastrite qui peut évoluer vers une atrophie de la muqueuse, favorisant l'apparition de métaplasies puis de dysplasies pour aboutir à un cancer gastrique.

La grande majorité des *Helicobacter* autres que *pylori* infectent différentes espèces animales et rarement l'homme. Leur pouvoir pathogène est encore controversé.

Parmi les *Helicobacter* gastriques autres que *pylori*, seul *H. helmannii* peut infecter l'homme. C'est l'hôte habituel du chien, du chat, du porc et des primates. Cette zoonose atteint l'homme de façon accidentelle. La prévalence de l'infection humaine à *H. helmannii* est très faible, de l'ordre de 0,5 %.

Indications du diagnostic

Les conférences de consensus recommandent le diagnostic et le traitement de l'infection à *H. pylori* dans les cas suivant :

- suspicion de maladie ulcéreuse duodénale ou gastrique, ou de lymphome gastrique du MALT, de gastrite atrophique, de dyspepsie persistante, de lésions gastriques prénéoplasiques, après chirurgie pour cancer de l'estomac ; mais aussi :
- prévention des lésions induites par prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens ou d'aspirine au long cours ;
- prévention du cancer gastrique en cas d'antécédent familial au premier degré, de chirurgie bariatrique par *by-pass* et de prise prolongée d'antisécrétoires ;
- anémie ferriprive inexpliquée ;
- carence inexpliquée en vitamine B_{12} ;
- purpura thrombopénique chronique idiopathique.

Diagnostic direct

Les méthodes permettant de faire le diagnostic d'une infection à *H. pylori* sont nombreuses et peuvent être regroupées en deux types :

- invasifs, nécessitant une biopsie de la muqueuse gastrique au cours d'un examen fibroscopique : examen anatomopathologique, culture, détection de séquences d'ADN spécifique par PCR, recherche d'une activité uréasique ;
- non invasifs : test respiratoire à l'urée marquée, détection d'antigènes dans les selles, sérologie.

Les performances de ces techniques sont diverses et nécessitent une stratégie diagnostique associant plusieurs d'entre elles pour obtenir une sensibilité optimale (Tableau 31.4). Certaines de ces techniques n'apportent que la notion de la présence ou non d'une infection à *H. pylori* (sérologie standard, antigènes dans les selles, test respiratoire, activité uréasique rapide). D'autres offrent la possibilité d'apprécier les conséquences de l'infection sur la muqueuse gastrique (anatomopathologie), d'établir l'antibiogramme et le typage de la souche infectante (culture), de rechercher certains gènes de résistance (culture, PCR sur biopsie). Le choix des techniques à mettre en œuvre sera fonction de l'étendue nécessaire des résultats recherchés et de la possibilité ou non de réaliser une endoscopie.

Méthodes invasives

L'avantage des méthodes invasives est de pouvoir associer les techniques diagnostiques les plus sensibles, les plus spécifiques et les plus contributives avec l'observation endoscopique des lésions qui permet d'identifier les lésions

Tableau 31.4 **Méthodes diagnostiques de l'infection à *Helicobacter pylori*.**

Méthodes diagnostiques	Sensibilité	Indications	Contribution
Invasives (biopsies)		Celles de l'endoscopie	
Anatomopathologie	>95 %	Systématique si biopsie	Bien si pathologiste expert atrophie, cancer, lymphome
Culture	>95 %	À associer à l'anatomopathologie car résistances	Permet antibiogramme délicat (12 jours)
PCR	>95 %	Complément de la culture	Rapide (4 heures) détection Résistance clarithromycine
Uréase	80 %	Au lit du patient	Rapide (1 heure), à confirmer
Non invasives			Résultat : + ou –
Test respiratoire	>95 %	*Test and treat* et contrôle d'éradication	Équipement coûteux
Ag dans les selles	>90 %		Simple, rapide (1 heure)
Sérologie	80–90 %	Études épidémiologiques	Persistance des anticorps

gastriques et d'évaluer leur étendue. Leur inconvénient majeur est de nécessiter le recours à une endoscopie digestive haute. Cette technique est maintenant facilement accessible et peu dangereuse mais reste relativement coûteuse.

Test à l'uréase

Son principe repose sur la forte activité uréasique d'*H. pylori* qui hydrolyse l'urée en ammoniaque. L'ammoniaque libérée accroît le pH du milieu de réaction et fait virer de couleur l'indicateur de pH. Les tests sur gélose (CLO-test®) ou sur membrane (Pyloritek®) sont les plus pratiques d'emploi. La lecture est effectuée après un délai d'une heure pendant lequel le kit doit être maintenu à 37 °C pour augmenter la sensibilité du test. Ce test a une sensibilité moyenne de 80 % et une spécificité de 95 %. La lecture précoce à 20 minutes, qui correspond plus à l'emploi pratique d'un test rapide, diminue la sensibilité et ne peut de ce fait être recommandée. La lecture à 24 heures est aussi à proscrire en raison de l'activité uréasique d'autres bactéries qui peuvent être présentes chez les malades hypo- ou achlorhydriques (*Proteus*). Ce test n'est pas actuellement remboursé par la Sécurité sociale; il n'est pas facturé au patient et est donc à la charge de l'établissement. En pratique, ce test est contributif en cas de positivité précoce car il permet en salle d'endoscopie de conclure à la présence d'*H. pylori* et de mettre en route aussitôt un traitement d'éradication.

Examen anatomopathologique

Il s'agit du moyen de détection le plus répandu. La sensibilité et la spécificité de cet examen sont supérieures à 95 %. Ces chiffres ne sont cependant obtenus qu'avec une standardisation rigoureuse de la méthode et une analyse par un anatomopathologiste expérimenté. La méthode doit comporter une fixation des biopsies dans le formol et adopter des colorations facilitant la reconnaissance de la bactérie au microscope (Giemsa modifié ou crésyl violet). En effet, la coloration habituelle à l'hémalun-éosine utilisée pour le diagnostic lésionnel visualise mal les bactéries. Cette méthode permet l'examen de la gastrite constamment associée à *H. pylori* et la recherche de complications telles que l'atrophie, la métaplasie intestinale avec dysplasie, le lymphome ou le cancer. La réalisation de biopsies multiples (au moins cinq) augmente la sensibilité de détection de l'infection et permet de classer la gastrite selon le score de Sydney et d'obtenir une classification opérationnelle en intégrant la topographie des lésions (OLGA, OLGIM).

Cette méthode a l'avantage d'être inscrite dans les habitudes des gastro-entérologues, d'être accessible et de nécessiter des conditions de transport extrêmement simples, puisque les biopsies plongées dans le formol peuvent être conservées à température ambiante lors de l'acheminement au laboratoire d'anatomopathologie. Sa sensibilité élevée en fait l'examen de référence pour le diagnostic invasif de l'infection, le couple histologie–culture étant toujours considéré comme le gold standard.

Culture

La culture est la méthode diagnostique la plus spécifique. L'intérêt principal de la culture est la détermination de la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques.

Prélèvement

Deux biopsies, antrale et fundique, sont recommandées pour obtenir la meilleure sensibilité.

Milieux de transport

H. pylori est très sensible à la dessiccation. Les biopsies gastriques doivent être acheminées rapidement au laboratoire dans un récipient stérile contenant 0,5 ml de sérum physiologique stérile et ensemencées dans les 2 heures qui suivent le prélèvement. Si le transport au laboratoire est prolongé plusieurs heures, un milieu de transport doit être utilisé et transporté à 4 °C. Plusieurs milieux de transports sont recommandés : bouillon Brucelle avec 20 % de glycérol, milieu de transport de Stuart (Oxoid), Portagerm® pylori (bioMérieux). Si le délai de transport dépasse 24 heures, la biopsie doit être acheminée congelée dans un tube sec. L'utilisation d'un container d'azote liquide est assez pratique entre l'unité de fibroscopie et le laboratoire.

Ces contraintes de transport sont un obstacle à la diffusion de la culture en pratique courante. Néanmoins, la mise en place d'un protocole de prélèvement et de transport des biopsies avec les gastro-entérologues est facilement réalisable.

Broyage des biopsies

Les biopsies doivent être broyées à l'aide d'un pilon à usage unique adapté aux microtubes, ou bien dilacérées au scalpel dans une boîte de Petri stérile.

Examen direct

Le produit de broyage est étalé en frottis sur une lame de microscope et coloré par la méthode de Gram. On peut également réaliser une empreinte par écrasement d'un fragment biopsique sur la lame. Il est préférable d'utiliser plutôt de la fuchsine comme contre-colorant lors de la coloration de Gram que la safranine habituelle. *H. pylori* apparaît comme une bactérie incurvée, spiralée, à Gram négatif.

H. pylori existe sous deux formes. Une forme bacillaire, spiralée, longue de 2 à 4 µm et large de 0,5 à 1 µm que l'on ne retrouve naturellement que dans l'estomac des malades infectés. C'est une forme cultivable, mobile par 5 à 7 flagelles polaires et engainés. Elle est caractérisée par sa forme en hélice qui a déterminé l'appellation du genre *Helicobacter*. C'est celle que l'on observe à l'examen direct des biopsies gastriques et des cultures. Elle est Gram négative.

Si l'on soumet les formes spiralées d'*Helicobacter* à des conditions de stress comme l'épuisement des ressources nutritives lors d'une culture prolongée, une atmosphère aérobie ou anaérobie pour cette bactérie microaérophile, la présence d'antibiotiques ou une température basse, la morphologie des bactéries se transforme. On observe tout d'abord des formes en U puis des formes en anneau pour aboutir à des formes rondes dites coccoïdes (voir Fig. 31.3).

Les formes coccoïdes sont aussi observées in vivo. On retrouve des formes coccoïdes dans l'estomac au niveau des lésions de la muqueuse, mais aussi dans la bouche, la plaque dentaire, l'intestin et les selles de patients infectés.

Les bactéries sont parfois regroupées en banc de poisson. La lecture de la lame à fort grossissement en immersion doit

être suffisamment prolongée pour conclure à la négativité de l'examen direct ; 30 à 50 champs doivent être observés.

Dans notre expérience, seuls 75 % des examens directs de biopsies qui seront positives en culture permettent d'observer des bacilles incurvés Gram négatif.

Ensemencement

Le produit de broyage ou de dilacération est ensemencé en séparation sur milieu constitué d'une base gélosée (milieu *Brucella*, cœur-cervelle, Columbia, Wilkins-Chalgren ou Mueller-Hinton) additionnée de 10 % de sang de cheval ou de mouton ou de sérum de veau fœtal. La base Columbia additionnée de 10 % de sang de mouton convient à la plupart des souches. Les milieux commercialisés conviennent également.

Des mélanges sélectifs peuvent être utilisés pour inhiber la croissance des contaminants occasionnels. Le mélange de Skirrow utilisé pour l'isolement sélectif de *Campylobacter* est adapté à l'isolement sélectif d'*H. pylori*. Il comprend de la vancomycine (10 mg/l), du triméthoprime (5 mg/l), de l'amphotéricine B (2 mg/l) et de la polymyxine (2500 UI/l). Nous conseillons de ne pas utiliser de gélose fraîchement préparée. Un vieillissement de 2 à 7 jours à 4 °C améliore la sensibilité de la culture.

Incubation

Les géloses sont incubées à 37 °C sous atmosphère humide et microaérobie, c'est-à-dire appauvrie en oxygène (5 %). Cette atmosphère est obtenue dans une jarre étanche à l'aide de sachets générateurs d'atmosphère microaérobie (Campygen®, Oxoid). En subculture, de nombreuses souches poussent en atmosphère enrichie en CO_2 à 10 %.

Isolement

En primoculture, les colonies apparaissent en 3 à 12 jours. Elles sont petites, ronde et luisantes. En subculture, la croissance est plus rapide, en 2 à 4 jours. Les primocultures doivent être incubées jusqu'à 12 jours et examinées tous les 2 jours à partir du 3e jour. Nous conseillons de ne pas attendre d'avoir de grosses colonies pour repiquer les cultures. La transformation en forme coccoïde peut être rapide et diminue fortement la cultivabilité de la souche ; ne pas attendre plus de 2 à 3 jours après l'apparition des colonies. Un réétalement sur la boîte d'isolement dès l'apparition des premières colonies permet une première amplification des souches, à condition que la zone de réétalement ne contienne pas de contaminant. La subculture à partir de colonies isolées est très difficile à obtenir, bien plus qu'à partir de l'ensemble des colonies récoltées à l'écouvillon et déchargé dans 100 µl de bouillon *Brucella*. Néanmoins, l'obtention de clones purs à partir de colonies isolées a un intérêt puisque l'infection par plusieurs souches d'*H. pylori* est possible (10 % des cas) et, surtout, le mélange de clones résistants et sensibles aux antibiotiques de la même souche est également observé dans 10 % des cas.

L'isolement d'*H. pylori* est donc délicat. La positivité des autres techniques mises en œuvre (uréase, examen direct, PCR, histologie, etc.) motivera la prolongation de l'incubation et surtout l'acharnement à obtenir la subculture des quelques colonies qui émergent sur la boîte d'isolement.

Le délai de réponse est de 3 à 12 jours en fonction des caractéristiques de la souche. La sensibilité de la culture dépend des performances du laboratoire et surtout des conditions du préanalytique (transport). Elle est d'au moins 95 % si l'on prend pour référence le test respiratoire ou la sérologie.

Identification bactériologique

L'identification du genre et de l'espèce *H. pylori* ne pose pas de problème. Les exigences culturales (microaérophilie, gélose au sang, milieu sélectif), l'aspect spiralé à l'observation microscopique après coloration de Gram d'une colonie étalée sur une lame permettent d'identifier *Helicobacter*. La présence d'une activité catalasique, oxydasique et uréasique forte permet l'identification de l'espèce *pylori*. Les *Helicobacter* non *pylori* ne cultivent pas dans les conditions décrites. Seul *H. helmannii* peut infecter l'estomac humain, mais sa morphologie à l'examen direct est caractéristique.

Test à l'uréase au laboratoire

Si l'activité uréasique n'a pas été recherchée au lit du malade, une partie du produit de broyage peut être mise en suspension dans 100 µl de milieu urée indole et placée à 37 °C. Le virage colorimétrique observé dans les heures qui suivent l'ensemencement permet de suspecter la présence d'*H. pylori*. Dans notre expérience, la sensibilité de ce test est faible, puisque 68 % des biopsies pour lesquelles la culture sera positive présentent une activité uréasique. Les faux positifs sont très peu nombreux, de l'ordre de 1,5 %, même quand l'incubation est prolongée jusqu'au lendemain. Ce test rapide a l'avantage au laboratoire de motiver, quand il est positif, un réexamen soigneux de l'examen direct initialement jugé négatif.

Congélation, envoi de souches

H. pylori peut être conservé plusieurs années à – 80 °C en bouillon *Brucella* supplémenté de 20 % de glycérol. Il est conseillé de congeler des cultures de moins de 48 heures contenant moins de 10 % de formes coccoïdes.

On peut éviter l'envoi de souche en Carboglace™ en coulant dans un tube à vis de 5 ml une gélose Columbia pauvre en agarose (5 g/l) et supplémentée de 10 % de sang de mouton dans laquelle on plonge et on casse l'extrémité d'un écouvillon stérile fortement chargé d'une culture de moins de 48 heures contenant moins de 10 % de formes coccoïdes. Un tel milieu de transport permet la conservation d'une souche à température ambiante pendant 2 à 3 jours.

Détection par amplification génique (PCR) de séquences d'ADN spécifiques d'*H. pylori*

La difficulté, le manque de sensibilité et le long délai de réponse de la culture ont motivé la mise au point de techniques génétiques rapides et spécifiques par PCR et maintenant par PCR temps réel. L'extraction de l'ADN à partir d'une biopsie gastrique est possible à l'aide de kits commercialisés voire d'extracteurs automatiques après une lyse par la protéinase K. De nombreuses amorces ont été proposées ; celles qui apportent une sensibilité et une spécificité maximales sont celles qui permettent d'amplifier des fragments

des gènes *glmM* codant la phosphoglucosamine mutase, *ureA* codant la sous-unité A de l'uréase, 26-kDa SSA et l'ARNr16S. L'utilisation d'une sonde d'hybridation pour révéler le fragment amplifié, soit par *Southern-blot*, soit maintenant par PCR temps réel, augmente la spécificité de la détection. Les performances en sensibilité sont très variables d'une technique à l'autre et selon la cible amplifiée, mais semblent supérieures à celle de la culture. La PCR a l'énorme avantage d'apporter un résultat bien plus rapide que la culture (2 à 24 heures). Elle est le plus souvent couplée à la détection des mutations conférant la résistance à la clarithromycine. Son automatisation à l'aide d'appareils qui réalisent extraction d'ADN et PCR temps réel représente une future étape vers sa diffusion large.

Cet examen n'est pas encore rentré dans la pratique courante. La disponibilité de ces tests est encore très limitée. Les premières trousses sont commercialisées, mais la tarification de ces techniques de PCR ou de PCR temps réel reste en actes de biologie hors nomenclature (BHN), rendant impossible le remboursement et donc la diffusion de ces techniques. Il s'agit pourtant de techniques d'avenir qui permettent le diagnostic de l'infection avec des conditions de prélèvement ou de transport moins contraignantes que pour la culture.

Méthodes non invasives

Ces tests ne nécessitent pas la pratique d'une gastroscopie.

Test respiratoire à l'urée marquée

Il s'agit d'un test global évaluant la présence de la bactérie quelle que soit sa situation dans la cavité gastrique. Sa sensibilité dépasse 90 %. Ce test est fondé sur l'activité uréasique de la bactérie. Il détecte la production de CO_2 marqué au carbone 13 à partir d'urée $_{13}C$ ingérée par le sujet. L'isotope $_{13}C$ du carbone n'est pas radioactif et peut être délivré sans précaution particulière. Le test doit être réalisé avant tout traitement ou au moins 4 semaines après la fin d'un traitement antibiotique et à deux semaines de l'arrêt des inhibiteurs de la pompe à protons (IPP). Le $_{13}CO_2$ est détecté dans l'air expiré juste avant et 30 minutes après l'ingestion de l'urée. Ce test nécessite que les malades soient à jeun pour ingérer, 5 minutes avant l'urée marquée, une solution d'acide citrique afin de retarder la vidange gastrique. Le prélèvement peut être adressé au laboratoire sans condition particulière de transport. La concentration de $_{13}CO_2$ dans l'air expiré est mesurée au laboratoire par un chromatographe en phase gazeuse et un spectromètre de masse. Cet appareillage coûteux et sophistiqué n'est disponible actuellement que dans quelques centres spécialisés auxquels les prélèvements peuvent être facilement adressés par la poste.

La prise d'IPP perturbe fortement les résultats de cette technique.

Détection des antigènes dans les selles

Ces tests détectent la présence d'antigènes d'*H. pylori* dans les selles par une technique ELISA ou immunochromatographique. Trois tests sont commercialisés : deux utilisent des anticorps monoclonaux (ImmunoCard STAT ! HpSA®, Meridian Bioscience, et FemtoLab HpSTAR®, Dako Cytomation), un des anticorps polyclonaux (Premier Platinum HpSA®, Meridian Bioscience). Les meilleures performances sont obtenues avec les tests utilisant des anticorps monoclonaux. Le plus pratique en utilisation clinique est le test immunochromatographique conditionné en tests unitaires et réalisé en 5 minutes.

La sensibilité et la spécificité de ce test sont légèrement inférieures au test respiratoire. Le test peut servir tant au diagnostic primaire qu'au contrôle d'éradication, bien que les informations soient encore insuffisantes quant à la fiabilité de ce test fécal pour le contrôle d'éradication chez les enfants. Le test doit être pratiqué avant tout traitement ou 4 semaines après l'arrêt du traitement. En pratique, rappelons qu'il ne faut utiliser que des échantillons de selles fraîches. Jusqu'à l'analyse, les selles doivent être stockées au maximum pendant 72 heures, dans un récipient étanche, et à une température de 2 à 8 °C, pour le transport au laboratoire. Si ce n'est pas possible, les selles doivent être congelées et envoyées congelées au laboratoire.

Diagnostic indirect : sérodiagnostic

De nombreux tests sont commercialisés. Leurs performances ont été évaluées par le Groupe d'études français des *Helicobacter* (GEFH) à la demande de l'Afssaps. Les tests rapides ont des performances trop limitées. Seuls les tests ELISA évaluant le taux sérique des immunoglobulines G anti-*H. pylori* ont des résultats performants. Pour certains, la sensibilité et la spécificité atteignent 98 %. Le taux des anticorps reste élevé pendant la durée de l'infection et diminue progressivement dans les 4 à 6 mois qui suivent la disparition de la bactérie. Du fait de ce délai, le test ne peut être utilisé pour évaluer le résultat de l'éradication. La sérologie peut être considérée comme test diagnostique dans les situations où les autres tests pourraient être faussement négatifs : ulcères hémorragiques, atrophie glandulaire, lymphome du MALT, utilisation récente d'antibiotiques ou d'IPP.

Changements récents de stratégie diagnostique et thérapeutique

Depuis 2009, la fréquence de la résistance primaire à la clarithromycine a dépassé 20 % en France, imposant un changement radical de la stratégie diagnostique et thérapeutique des infections à *H. pylori*. Jusqu'alors les conférences de consensus recommandaient une stratégie du *test and treat* utilisant un test non invasif (test respiratoire ou recherche d'antigènes dans les selles) et un traitement empirique de 7 à 14 jours comportant un IPP, de l'amoxicilline et soit de la clarithromycine, soit du métronidazole. L'efficacité de cette stratégie est maintenant trop fortement entamée par l'augmentation des résistances aux antibiotiques responsables d'échecs thérapeutiques chez presque 40 % des personnes traitées.

Les nouvelles recommandations européennes ou nationales sont d'utiliser, chaque fois que c'est possible, une stratégie thérapeutique fondée sur les résultats de tests de détection de la résistance aux antibiotiques et principalement à la clarithromycine. L'isolement, la culture et

l'antibiogramme sont malheureusement pour l'instant rarement accessibles en dehors de quelques centres spécialisés. La diffusion de ces techniques est nécessaire pour répondre au besoin d'un traitement. La PCR et surtout la PCR temps réel sont une alternative intéressante pour leur rapidité et leur relative facilité. Deux conditions sont encore nécessaires pour en faire l'outil diagnostique de choix : l'automatisation à l'aide d'automates et de kits commercialisés, et la cotation en B pour un remboursement les rendant accessibles en ville où le besoin est le plus grand.

En l'absence d'un recours à l'antibiogramme, les deux traitements empiriques recommandés sont la quadrithérapie séquentielle (5 jours IPP–amoxicilline, 5 jours IPP–clarithromycine–métronidazole) et la quadrithérapie bismuthée (14 jours IPP–Pyléra® [bismuth–métronidazole–tétracycline]). Plusieurs études démontrent une très bonne efficacité de ces nouveaux traitements empiriques (95 % de réussite), mais ils n'ont jamais été évalués en France où la résistance aux antibiotiques est élevée.

Le contrôle d'éradication est indispensable. Il est réalisé à l'aide d'un test non invasif permettant de détecter une infection active. Seuls le test respiratoire et la recherche d'antigènes dans les selles répondent à cette indication. La sérologie n'a pas d'indication dans le contrôle de l'éradication. Les tests doivent être réalisés 4 à 6 semaines après la fin d'un traitement antisécrétoire ou antibiotique.

Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques utilisés pour le traitement d'éradication d'*H. pylori* est telle (clarithromycine 23 %, métronidazole 53 %) que la détermination de la sensibilité aux antibiotiques devient un élément majeur de la stratégie thérapeutique pour la mise en route d'un traitement adapté et efficace. La détermination de la CMI (E-test®) permet une mise en évidence fiable de la résistance à la clarithromycine et à la lévofloxacine dans un premier temps, à la tétracycline et à la rifampicine si un complément est nécessaire, alors que la détermination de la sensibilité au métronidazole est trop peu reproductible et n'est donc pas conseillée, et que celle à l'amoxicilline n'est pas nécessaire du fait du caractère exceptionnel de la résistance. L'antibiogramme d'*H. pylori* est rendu délicat par la croissance lente de cette bactérie fastidieuse, par la propension de cette bactérie à évoluer rapidement sous sa forme coccoïde non cultivable. Cette difficulté d'obtenir un inoculum fort et cultivable entraîne fréquemment la nécessité de plusieurs subcultures et prolonge donc le délai de réponse. Il faut en moyenne 12 jours après la fibroscopie pour pouvoir rendre l'antibiogramme. Ce délai prolongé et les difficultés de la culture ont motivé la mise au point de techniques de biologie moléculaire (PCR, PCR temps réel, sondes) pour pouvoir apporter une réponse dans les 24 heures qui suivent la fibroscopie en recherchant directement sur la biopsie les mutations responsables de la résistance. Ces techniques ont été particulièrement développées pour la recherche des mutations conférant la résistance à la clarithromycine.

Méthodes

La dilution en agar est considérée comme la méthode de référence. Elle a fait l'objet de standardisations et de recommandations par le Clinical Laboratory Standards Institute américain et par l'European *H. pylori* Study Group. Elle est utilisable lors d'études épidémiologiques mais n'est pas adaptée à une pratique quotidienne.

Les méthodes de diffusion (E-test®) sont les plus simples et les plus adaptées à la pratique quotidienne d'un laboratoire de biologie clinique. Elles ont fait l'objet de standardisation et de validation par le GEFH pour la détermination de la sensibilité de la clarithromycine. Ces recommandations ont été validées par le CA-SFM.

Cette méthode n'a pas pu être validée pour le métronidazole par manque de reproductibilité ; elle n'est donc pas conseillée.

La méthode par diffusion utilisant l'E-test® permet une détermination fiable de la CMI de la clarithromycine (Fig. 31.5) et de la lévofloxacine. Là aussi, la détermination de la CMI du métronidazole n'est pas reproductible et n'est pas corrélée avec les autres méthodes. La détermination de la CMI d'autres molécules n'a pas d'intérêt dans un premier temps. En cas de résistances multiples et d'échecs thérapeutiques, la sensibilité à la tétracycline et à la rifampicine peut apporter des possibilités thérapeutiques.

Les techniques moléculaires ont surtout été développées pour la détection des mutations conférant la résistance à la clarithromycine et aux fluoroquinolones. Elles permettent une détection en quelques heures de la résistance au lieu de quelques jours pour l'antibiogramme classique. Après une extraction de l'ADN, le fragment du gène où sont localisées les mutations est amplifié par PCR. Une technique de PCR multiplex révélée par hybridation sur bandelette est commercialisée en France (HelicoDR®, Hain, BioCentrics). Elle permet la détection d'*H. pylori*, des mutations conférant la résistance à la clarithromycine et des principales mutations conférant la résistance à la lévofloxacine. Différentes techniques de PCR temps réel ont été mises au point, raccourcissant encore le délai de réponse et diminuant le risque de contamination par manipulation de produits amplifiés.



Fig.31.5 Détermination de la sensibilité à la clarithromycine par les méthodes en diffusion : disque d'érythromycine, E-test® de clarithromycine.

Utilisées directement sur les biopsies gastroduodénales, elles fournissent un résultat 2 heures après la réception de la biopsie au laboratoire. Leur adaptation prochaine à des automates d'extraction et de PCR temps réel en fera un outil de diagnostic des infections à *H. pylori* et de détection de la résistance, permettant de répondre au large besoin d'une technique accessible.

Conclusion

Le diagnostic de l'infection à *H. pylori* est d'indication de plus en plus large pour une infection encore fréquente. La fréquence de plus en plus élevée des résistances aux antibiotiques utilisés et particulièrement à la clarithromycine rend désormais la détermination de la sensibilité à cet antibiotique très profitable à la réussite d'un traitement d'éradication. Ce changement stratégique (traitement adapté aux détections des résistances plutôt que traitement empirique) va solliciter un afflux de biopsies gastriques aux laboratoires. Il faut que les biologistes puissent répondre à cette demande qui permet une meilleure réussite thérapeutique. L'isolement, la culture et l'antibiogramme d'*Helicobacter pylori* doivent, malgré leurs difficultés de réalisation, être plus largement accessibles à la prise en charge des très nombreux malades infectés. La détermination de la sensibilité à la clarithromycine est maintenant bien validée pour la méthode du E-test®. Les méthodes moléculaires (PCR, PCR temps réel) qui permettent une détection rapide et fiable directement sur les biopsies gastroduodénales représentent une alternative à la culture. Automatisation et cotation à la nomenclature des actes de biologie médicale sont les deux conditions pour en faire un outil diagnostique de première ligne pour assurer un traitement efficace aux malades devant bénéficier d'une éradication.

Pour en savoir plus

Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. The European Helicobacter Study Group EHSG). Management of Helicobacter pylori infection-the Maastricht IV/Florence Consensus Report Gut 2012 ; 61 : 646–64.

Lamarque D, Burucoa C, Courillon-Mallet A, et al. et le Groupe d'Études Français des Helicobacter. Révision des recommandations françaises sur la prise en charge de l'infection par Helicobacter pylori. Hépato-Gastro Oncologie Digestive 2012 ; 19 : 475–502.

Burucoa C, Delchier JC, Courillon-Mallet A, et al. Comparative evaluation of 29 commercial Helicobacter pylori serological kits. Helicobacter 2013 ; 18 : 169–79.

Megraud F, Coenen S, Versporten A, et al. on behalf of the Study Group participants. Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic onsumption. Gut 2013 ; 62 : 34–42.

Mégraud F. Helicobacter pylori. In : Courvalin P, Leclercq R, editors. L'antibiogramme. 3e éd Paris : ESKA ; 2012.

Raymond J, Lamarque D, Kalach N, et al. High level of antimicrobial resistance in French Helicobacter pylori isolates. Helicobacter 2010 ; 15 : 21–7.

www.helicobacter.fr/ (site du Groupe d'étude français des Helicobacter [GEFH]).

Bacilles à Gram positif (à l'exception des anaérobies)

PLAN DU CHAPITRE

Les bacilles à Gram positif qui poussent en aérobiose et qui sont susceptibles d'être pathogènes pour l'homme ou d'être rencontrés dans des prélèvements d'origine humaine sont nombreux. La morphologie de certains d'entre eux est assez évocatrice pour que, d'emblée, on puisse les rattacher à un genre bactérien précis : c'est habituellement le cas des bactéries appartenant aux genres *Corynebacterium, Bacillus, Nocardia* et *Actinomyces*.

Une orientation diagnostique pourra être obtenue en considérant la nature du prélèvement et son origine. Un certain nombre de caractères simples indiqués au Tableau 32.1 permettent une orientation diagnostique.

32.1 *Corynebacterium* et genres apparentés

O. Barraud, F. Denis, M.-C. Ploy, V. Cattoir

Généralités

Les corynébactéries ou corynéformes comprennent des bacilles à Gram positif non sporulés, immobiles, non filamenteux. Ils sont aérobies stricts, aéro-anaérobies facultatifs ou anaérobies préférentiels et présentent classiquement une morphologie particulière irrégulière avec des renflements à une ou aux deux extrémités ; ils sont souvent disposés en amas. Sous cette définition, sont compris le genre *Corynebacterium* mais aussi de nombreux autres genres bactériens (Tableau 32.2).

La plupart des espèces sont commensales de l'homme ou des animaux, mais les corynébactéries existent aussi dans l'environnement. Très peu d'espèces sont pathogènes, mais elles ne sauraient être ignorées ; la plus connue, *Corynebacterium diphtheriae*, responsable de la diphtérie, doit rester présente dans la mémoire des microbiologistes. Parmi les espèces commensales, *C. jeikeium* et *C. urealyticum* se rencontrent avec une certaine fréquence, favorisées par des terrains fragilisés et les traitements antibiotiques à large spectre.

Les bactéries appartenant au genre *Corynebacterium* ont généralement un type respiratoire aéro-anaérobie facultatif, bien que certaines espèces (par exemple *C. fermentans*, *C. jeikeium* et *C. urealyticum*) poussent mal en anaérobiose.

Les bactéries appartenant au genre *Dermabacter*, *Turicella* et *Rothia* ont aussi un type respiratoire aéro-anaérobie facultatif.

Tableau 32.1 Caractères généraux distinctifs d'orientation vers les différents genres au sein des bacilles à Gram positif aérobies.

Bacilles Gram +	Morphologie	Culture sur gélose sang 5 % en aérobiose	Catalase	Mobilité à 37 °C	Origines
Corynebacterium		+	+	–	Oropharynx, pus, ulcérations cutanées, infections oculaires
Lactobacillus		–	–	–	Commensaux du vagin, de l'intestin, de la bouche En général, non pathogènes Exceptionnellement, endocardites
Listeria		+	+	–[a]	Méningites, bactériémies, suppurations diverses, infections néonatales Répandues dans l'environnement
Erysipelothrix		+	–	–	Infections cutanées, endocardites, infections articulaires
Bacillus		+	+	+[b]	Infections cutanées et septicémiques avec *B. anthracis* Toxi-infections alimentaires : *B. cereus* Très répandus dans la nature
Nocardia et *Actinomyces*		+[c]	–	–	Infections bronchopulmonaires, infections cutanées, suppurations diverses Parfois bactériémies Très répandus dans la nature

a *L. monocytogenes* est mobile à 22 °C.
b Sauf *Bacillus anthracis* qui possède de plus une capsule.
c Sauf *Actinomyces*.

Tableau 32.2 Caractéristiques générales des corynébactéries et des genres apparentés.

Genre	Aspect microscopique	Type respiratoire	Catalase	Pigmentation	Autre(s) caractéristique(s)
Corynebacterium	Bacilles à extrémités renflées regroupés en palissades ou « lettres chinoises »	AAF	+	– (J, G)	
Turicella	Bacilles longs et fins	AS	+	–	
Arthrobacter	Cycle coccibacille	AS	+	–	
Brevibacterium	Cycle coccibacille	AS	+	– (J)	Odeur de fromage
Dermabacter	Coccoïdes	AAF	+	–	
Helcobacillus	Bacilles courts	AAF	+	–	
Rothia	Polymorphe	AAF	+	– (G)	
Auritidibacter	Coccoïdes	AS	+	–	
Actinomyces	Bacilles fins avec branchements rudimentaires	AP	–(+)	–	
Actinobaculum	Bacilles courts	AP	–	–	
Propionibacterium	Bacilles avec branchements rudimentaires	AP	+	–	
Gardnerella	Coccoïdes Gram variable	AP	–	–	
Arcanobacterium	Bacilles courts	AP	–	–	
Trueperella	Bacilles courts	AP	–	–	

Oerskovia	Coccoïdes, bacilles Filaments rudimentaires	AAF	+	J, O	
Cellulosimicrobium	Bacilles Filaments rudimentaires	AAF	+	J, O	
Curtobacterium	Bacilles courts	AS	+	J, O	
Microbacterium	Bacilles fins Formes coccoïdes	AAF	+(–)	J, O	
Leifsonia	Bacilles fins	AS	+	J, O	Toujours mobile Oxydase +
Cellulomonas	Bacilles fins	AAF	+	J, O	
Exiguobacterium	Bacilles courts	AAF	+	J, O	
Rhodococcus	Coccoïdes	AS	+	R, O	Partiellement AAR
Dietzia	Coccoïdes	AS	+	J, O	
Gordonia	Bacilles courts	AS	+	O (R, G)	Partiellement AAR
Tsukamurella	Bacilles longs	AS	+	– (J, O)	Partiellement AAR

AAF : aéro-anaérobie facultatif ; AAR : acido-alcoolo-résistant ; AP : anaérobie préférentiel ; AS : aérobie strict.
Pigmentation : G, gris ; J, jaune ; O, orange ; R, rose.

Les bactéries de type anaérobie préférentiel appartiennent aux genres *Arcanobacterium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*. Les deux derniers genres ne seront pas évoqués dans ce chapitre.

Enfin, d'autres corynébactéries ont un type respiratoire aérobie strict ; les plus courantes en clinique sont *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*.

Habitat et pouvoir pathogène

Comme mentionné ci-dessus, la grande majorité des corynébactéries sont des constituants de la flore normale de l'homme ou des animaux et sont donc souvent retrouvées comme contaminants des prélèvements cliniques. Ainsi, une infection à corynébactérie peut être suspectée si ce micro-organisme est isolé d'un site stérile (surtout s'il est associé à un examen direct positif), s'il est très abondant et majoritaire dans un site non stérile (avec présence de leucocytes à l'examen direct) ou si sa quantification dans les urines est $> 10^4$ UFC/ml (en culture monomicrobienne) ou $> 10^5$ UFC/ml (prédominance en culture polymicrobienne) et avec une leucocyturie significative.

Corynebacterium du complexe *diphtheriae*

Ce complexe comprend trois espèces qui se distinguent par leurs réservoirs et leurs modes de transmission. *C. diphtheriae* est un pathogène strictement humain alors que les espèces *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis* sont essentiellement pathogènes chez l'animal, les cas humains étant liés à une transmission zoonotique.

Le réservoir de *C. diphtheriae* est humain et possiblement environnemental. La transmission interhumaine se fait essentiellement par les sécrétions nasopharyngées, plus rarement par contact direct à partir d'un portage cutané, voire sur le mode indirect par du matériel souillé. Le portage de souches non toxinogènes de *C. diphtheriae* est relativement fréquent, mais des souches toxinogènes importées peuvent aussi circuler chez des porteurs asymptomatiques. À noter qu'il existe 4 biotypes de *C. diphtheriae* (belfanti, gravis, intermedius et mitis) et que les cas de diphtérie sont dus aux biotypes gravis et mitis.

C. ulcerans a été isolé chez des animaux sauvages, de ferme ou domestiques, dont le chien et le chat qui sont les réservoirs connus. La contamination est liée à l'ingestion de produits laitiers non pasteurisés ou plus souvent par contact direct avec des animaux domestiques sains ou malades. *C. pseudotuberculosis* est l'agent étiologique de la lymphadénite caséeuse chez les animaux de ferme. Cette bactérie est rarement responsable d'une pathologie d'inoculation au niveau de plaies cutanées préexistantes, la lymphadénite nécrosante.

Ces trois espèces sont capables d'exprimer la toxine diphtérique si elles sont infectées par un corynéphage β porteur du gène *tox*. La toxine diphtérique est une exotoxine de type AB qui inhibe le facteur d'élongation EF-2 eucaryote par ADP-ribosylation, ce qui résulte en l'arrêt de la synthèse protéique et l'apoptose cellulaire.

La diphtérie est une maladie infectieuse et toxinique due à *C. diphtheriae* ou *C. ulcerans* exprimant la toxine diphtérique quelle qu'en soit la présentation clinique. Elle se présente habituellement sous la forme d'une infection aiguë localisée à l'oropharynx, l'angine à fausses membranes. Après une incubation de 2 à 5 jours, les premiers symptômes associent signes généraux (fièvre, céphalées, malaise) et locaux (dysphagie). À la phase d'état, c'est une angine avec des amygdales rouges et tuméfiées recouvertes d'un enduit blanchâtre (fausses membranes) et des adénopathies cervicales. À noter que des formes atténuées d'angine diphtérique ont été récemment décrites, notamment chez les malades incomplètement vaccinés, avec une plus faible mortalité.

La gravité de l'angine diphtérique (taux de mortalité de 2 à 10 %) est liée :

- à l'extension locorégionale des fausses membranes vers le larynx (laryngite diphtérique ou croup) avec risque d'asphyxie par obstruction des voies aériennes supérieures ;
- au syndrome toxinique qui peut se manifester au niveau du cœur par une myocardite (1 à 3 semaines après le début des symptômes ; taux de mortalité de 40 à 50 %) et/ou du système nerveux périphérique par des atteintes neurologiques précoces (paralysies vélopalatines et/ou oculomotrices ; vers le 10e jour) ou tardives (polyradiculonévrite diphtérique ou syndrome malin de Grenet et Mezart ; entre 6 et 8 semaines).

Il existe aussi une seconde entité clinique, la diphtérie cutanée, qui est endémique dans les pays tropicaux. Les cas autochtones concernent des personnes vivant en conditions de précarité. L'infection survient généralement sur une lésion préexistante tandis qu'elle se complique rarement d'un syndrome toxinique.

À côté des souches toxinogènes, les souches de *C. diphtheriae tox-* peuvent être responsables d'infections locales (par exemple diphtérie cutanée, angines) ou invasives telles que des bactériémies, des endocardites, des infections ostéoarticulaires ou des sinusites (avec une prédominance du biotype belfanti).

Grâce aux programmes de vaccination massive lancée dans les années 1930, la diphtérie a quasiment disparu dans les pays industrialisés. Cependant, elle reste endémique dans certaines parties du monde, notamment le sous-continent indien. En 2014, 7321 cas de diphtérie ont été déclarés par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) dont 6094 (83 %) provenant d'Inde et 1079 (15 %) du Népal. À noter également qu'une grande épidémie, principalement due à la diminution de la couverture vaccinale, a eu lieu entre 1991 et 1996 dans les pays de l'ex-URSS, avec plus de 150 000 cas et environ 4000 décès.

En France, la diphtérie est contrôlée depuis 1945 et aucun cas n'a été déclaré entre 1990 et 2001. Depuis 2002, 173 isolats ont été reçus au Centre national de référence (CNR), dont 50 souches *tox* + (10 *C. diphtheriae* et 40 *C. ulcerans*). Tous les isolats de *C. diphtheriae* ont été obtenus à partir de cas importés (Mayotte). Les cas dus à *C. ulcerans* étaient majoritairement des personnes possédant des animaux de compagnie ou en contact régulier avec des personnes ayant des animaux de compagnie. En 2014, les 7 cas étaient des diphtéries cutanées.

Corynebacterium non diphtériques

L'incidence d'infections opportunistes dues à ces bactéries est croissante, notamment chez les patients immunodéprimés et en cas de chirurgie ou de procédures invasives. Le caractère commensal des *Corynebacterium* spp. fait qu'ils peuvent souvent être considérés comme des contaminants des prélèvements cliniques. Cependant, de nombreux cas d'infections ont été confirmés (Tableau 32.3a).

C. jeikeium (anciennement CDC group JK) est une espèce commensale de certaines zones cutanées, notamment chez le patient hospitalisé, et peut aussi être retrouvé dans l'environnement hospitalier. D'ailleurs, une transmission nosocomiale est possible. Son pouvoir pathogène concerne surtout les patients porteurs de matériels étrangers (sondes,

Tableau 32.3a **Infections humaines dues aux *Corynebacterium* non diphtériques.**

Espèce	Types d'infections						
	Bactériémies	Endocardites	Infections sur matériel	Infections respiratoires	Infections de plaies	Infections urinaires	Autres infections
C. accolens	+			+			
C. amycolatum	+		+		+	+	
C. aurimucosum							Urogénitales (femme ++)
CDC group F-1						+	
C. glucuronolyticum (anc. *C. seminale*)							Urogénitales (homme ++)
C. jeikeium (anc. CDC group JK)	+	+	+		+		Méningites
C. kroppenstedtii							Mastite granulomateuse (sein)
C. macginleyi							Oculaires
C. minutissimum				+	+	+	Érythrasma ?
C. pseudodiphtheriticum		+		+			
C. resistens	+						
C. riegelii						+	
C. striatum		+	+	+	+		
C. tuberculostearicum	+	+	+		+		
C. urealyticum (anc. CDC group D-2)	+				+	+	
C. xerosis	+	+	+	+	+		

cathéters, prothèses) qui sont le point de départ d'infections (par exemple bactériémies sur cathéter, méningites postneurochirurgicales, infections urinaires sur sonde).

C. urealyticum (anciennement CDC group D-2) est responsable de 2 à 5 % des infections urinaires en milieu urologique hospitalier. D'un point de vue physiopathologique, cette bactérie est pourvue d'une très forte activité uréasique qui provoque une alcalinisation des urines permettant la formation de calculs phospho-ammoniaco-magnésiens (struvite). Cette lithiase infectieuse peut former des plaques minérales qui s'incrustent dans la paroi vésicale, ce qui est à l'origine de la classique cystite incrustée à urines alcalines.

C. glucuronolyticum (anciennement *C. seminale*) n'est retrouvé que dans des prélèvements urogénitaux et a été incriminée dans les prostatites, urétrites et épididymites.

C. amycolatum et *C. striatum* font partie de la flore commensale cutanée et sont donc fréquemment isolés à partir des prélèvements cliniques. Ces espèces sont souvent isolées dans les infections polymicrobiennes et leur rôle pathogène peut être difficile à établir.

Genres apparentés corynéformes

Comme les espèces de *Corynebacterium* non diphtériques, la plupart des bactéries corynéformes appartenant à d'autres genres font partie des flores commensales et sont peu pathogènes. Cependant, elles peuvent être responsables d'infections opportunistes sur terrains débilités. Il y a également des bactéries d'origine animale ou environnementale (Tableau 32.3b).

Rhodococcus equi a une morphologie de coccobacille. Cette espèce est bien connue dans le monde vétérinaire. Elle est responsable essentiellement d'infections chez les équidés et se retrouve longtemps dans le sol et le fumier. Chez l'homme, cette espèce est à l'origine d'infections graves chez des patients immunodéprimés (VIH ++, traitements anticancéreux ou immunosuppresseurs). L'atteinte pulmonaire est la plus fréquente, mais des abcès cérébraux et des ostéomyélites ont aussi été décrits.

Diagnostic bactériologique

Prélèvements

Un prélèvement de gorge doit être pratiqué devant toute angine à fausses membranes. Il doit être réalisé sous contrôle visuel et si possible avant tout traitement. On peut procéder :

- à un écouvillonnage (plusieurs écouvillons) à la périphérie de la fausse membrane (amygdales, voile, luette), plus rarement à un écouvillonnage nasal ou à un prélèvement de sérosités cutanées ou conjonctivales ;
- à un prélèvement de fausse membrane à la pince. Dans certains cas de croup, les fausses membranes observées lors de l'intubation doivent être prélevées.

Le prélèvement doit être acheminé au laboratoire sans délai, avant dessèchement, en précisant clairement s'il existe une suspicion clinique de diphtérie. L'utilisation d'un milieu de transport (type Amies) est possible avec une conservation à température ambiante ou à +4 °C.

À partir d'hémocultures dans un contexte d'endocardite, on peut aussi isoler des souches de *C. diphtheriae* non toxinogènes.

À part les cas de diphtéries, les autres corynébactéries ne nécessitent pas de précautions particulières pour l'acheminement au laboratoire. Différents prélèvements peuvent être effectués (urines, sperme, hémocultures, pus, prélèvements respiratoires, cutanés, etc.).

Tableau 32.3b **Caractères différentiels des principales espèces de *Corynebacterium*, d'*Arcanobacterium* et de *Rhodococcus*.**

	Catalase	Lipophilie	Nitrate réductase	Uréase	β-glucuronidase	Fermentation		Pyrazinamidase	Phosphatase alcaline
						Glucose	Saccharose		
C. resistens	+	–	–	–	–	+	–	–	+
T. otitidis	+	–	–	–	–	–	–	ND	ND
C. striatum	+	–	+	–	–	+	+	+	+
C. diphtheriae	+	–	+	–	–	+	–	–	–
C. pseudotuberculosis	+	–	V	+	–	+	V	–	V
C. pseudodiphtheriticum	+	–	+	+	–	–	–	+	V
C. ulcerans	+	–	–	+	–	+	V	–	+
C. xerosis	+	–	V	–	–	+	+	+	+
C. jeikeium	+	+	–	–	–	+	–	+	+
C. urealyticum	+	+	–	+	–	–	–	+	V
A. haemolyticum	–	ND	–	–	–	+	V	V	ND
R. equi	+	ND	+	+	–	–	–	ND	ND
C. seminale	+	–	V	+	+	+	+	+	–
C. amycolatum	+	–	V	V	–	+	V	ND	+
Dermabacter hominis	+	–	–	–	–	+	+	ND	ND
Brevibacterium casei	+	–	V	–	–	–	–	ND	ND

A : *Arcanobacterium* ; ND : non déterminé ; R : *Rhodococcus* ; T : *Turicella*.

Examen microscopique

En cas de suspicion de diphtérie ou dans le contexte d'un portage de *C. diphtheriae* dans l'entourage du patient, on procède à un examen des frottis de gorge après coloration :

- de Gram à la recherche de bacilles à Gram positif ayant une morphologie évocatrice. Classiquement, *C. diphtheriae* se présente sous forme de bacilles de 1 à 8 µm/0,3 à 0,8 µm droits ou légèrement incurvés avec des extrémités arrondies ou renflées (aspect en massue ou en haltère) (Fig. 32.1 et 32.2). Ces bacilles sont caractérisés par leur groupement (disposés en petits amas, en palissades ou en « lettres chinoises ») du fait de leur séparation incomplète ;
- de Neisser, d'Ernst-Neisser ou de Loeffler permettant de colorer spécifiquement les granulations métachromatiques aux extrémités (encadré 32.1).

Mais il faut savoir que les bactéries les plus toxinogènes, biotype gravis, sont le plus souvent très courtes, sans morphologie évocatrice, sans granulations.

Malgré l'impatience des cliniciens, le biologiste même entraîné ne peut conclure à partir de l'examen direct qu'à l'absence ou à la présence de bacilles diphtérimorphes sans aller plus loin dans ses conclusions.

Dans le cas des infections urinaires à *C. urealyticum* (notamment chez une personne âgée), il est possible de noter la présence de nombreux bacilles à Gram positif corynéformes à l'examen direct d'une urine généralement très alcaline et contenant des leucocytes.



Fig. 32.1 Aspect en massue d'une corynébactérie en microscopie électronique.

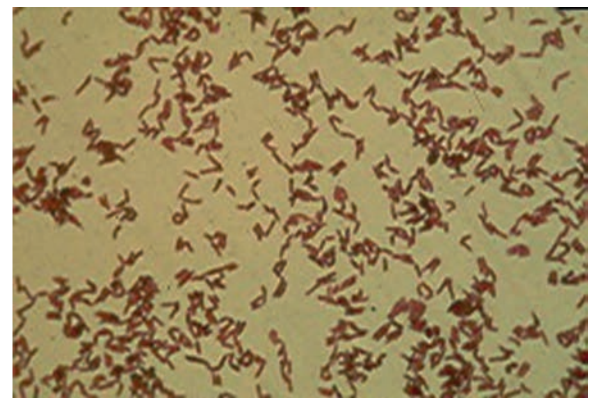


Fig. 32.2 Examen direct de corynébactéries après coloration de Gram.

Mise en culture

La présence très fréquente de corynébacteries commensales au niveau des muqueuses et de la peau complique le diagnostic, notamment direct, et requiert des milieux sélectifs pour isoler *C. diphtheriae*.

Deux types de milieux peuvent être ensemencés :

- des milieux riches tels que Mueller-Hinton, trypticase-soja, gélose au sang voire, si on en dispose, milieu de Loeffler au sérum de bœuf coagulé, ou des milieux additionnés de Tween 80® (0,1 à 1 %) afin de faciliter la croissance des espèces lipophiles (voir ci-dessous) ;
- des milieux sélectifs comme des géloses au sang à l'acide nalidixique ou géloses au sang sélectives contenant de la fosfomycine (100 µg/ml + 12,5 µg/ml de glucose 6-phosphate) ou avec le dépôt d'un disque de fosfomycine (50 µg), les corynébactéries étant hautement résistantes à cet antibiotique (sauf *Rothia*, *Dermabacter* et *Actinomyces*).

On peut également ensemencer un bouillon type cœur-cervelle. À noter que les corynébactéries ne cultivent pas sur gélose MacConkey et que les espèces lipophiles de *Corynebacterium* (voir ci-dessous) donnent des fines colonies sur gélose au sang et ne poussent pas sur des milieux moins riches.

Pour *C. diphtheriae*, même si les milieux usuels cités ci-dessus permettent d'isoler les souches sans difficulté, le recours à des milieux spécifiques peut être utile, comme le milieu de Tinsdale (gélose cystine-tellurite). Sur ce milieu, les colonies de *C. diphtheriae* sont noires (réduction du tellurite de potassium) et entourées d'un halo brun foncé (production de H_2S à partir de L-cystine par la cystinase bactérienne). Cependant, ce milieu n'est plus guère utilisé en routine du fait de la rareté de l'isolement de ce pathogène et de sa rapide péremption (1 semaine).

La majorité des corynébactéries poussent à 37 °C et leur croissance est facilitée sous 5 % de CO_2. Les cultures seront observées sur 48 heures, mais sur milieux riches, des colonies peuvent apparaître en 16 à 18 heures.

Après incubation à 37 °C en atmosphère enrichie avec 5 % de CO_2, il a été décrit une croissance en satellitisme de *Staphylococcus aureus* pour certaines souches lipophiles. Une β-hémolyse a été décrite pour certaines souches de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* et *C. pseudotuberculosis*.

Identification

Classiquement, l'identification des corynébactéries était fondée sur plusieurs réactions : catalase, test de fermentation/oxydation, mobilité, réduction des nitrates, hydrolyse de l'urée et de l'esculine, production d'acides à partir du glucose, maltose, saccharose, mannitol et xylose, CAMP test et test de lipophilie. La plupart de ces tests étaient inclus dans des galeries manuelles, type Api Coryne® (bioMérieux) ou RapidID CB Plus system® (Remel), ou automatisées type carte ANC sur Vitek® 2. Ces techniques sont de moins en moins utilisées de nos jours.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est devenue la principale technique d'identification bactérienne du fait de sa fiabilité et de sa rapidité. Alors que deux types d'appareil existent (Microflex® de Bruker Daltonics et Vitek® MS de bioMérieux), il existe trois banques de données (Biotyper de Bruker Daltonics, Saramis de bioMérieux et Andromas) qui

présentent des performances similaires quant à l'identification des corynébactéries. Environ 85 à 90 % des isolats cliniques sont identifiables au niveau de l'espèce par cette technique. À noter que les espèces *C. minutissimum* et *C. aurimucosum* sont difficilement différentiables. Au sein de l'espèce *C. diphtheriae*, la distinction entre les biotypes ne peut pas être obtenue par spectrométrie de masse MALDI-TOF et quelques caractères phénotypiques peuvent s'avérer utiles (Tableau 32.4). À noter que les souches du biotype belfanti ne sont pas toxinogènes.

Quelques tests phénotypiques peuvent rester utiles et sont facilement réalisables au laboratoire. C'est le cas du CAMP test (pour Christie, Atkins et Munch-Petersen, les inventeurs du test en 1944) qui est un test permettant de mettre en évidence la potentialisation de la β-hémolyse d'une souche β-hémolytique de *S. aureus* (ATCC 25923) (Fig. 32.3). Ce test est positif pour *C. auris*, *C. glucuronolyticum* et *T. otitidis*. La recherche de la lipophilie, en comparant la culture sur gélose trypticase-soja avec ou sans Tween 80® (0,1 à 1 %), permet de distinguer les espèces lipophiles du genre *Corynebacterium* : *C. accolens*, CDC group F-1, *C. jeikeium*, *C. kroppenstedtii*, *C. macginleyi*, *C. resistens*, *C. tuberculostearicum* et *C. urealyticum*. Ces espèces donnent des colonies jusqu'à 2 mm de diamètre sur gélose avec Tween 80® alors que le diamètre des colonies obtenues sans Tween 80® sont < 0,5 mm (Fig. 32.4).

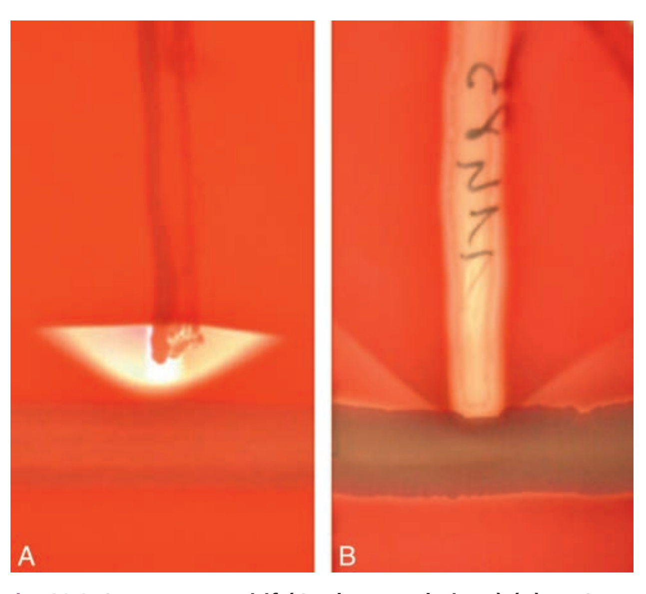


Fig. 32.3 CAMP test positif (*C. glucuronolyticum*) (A) et CAMP test « *reverse* » (*A. haemolyticum*) (B). Les stries ont été faites perpendiculairement par rapport à la strie horizontale de *S. aureus* ATCC 25923.

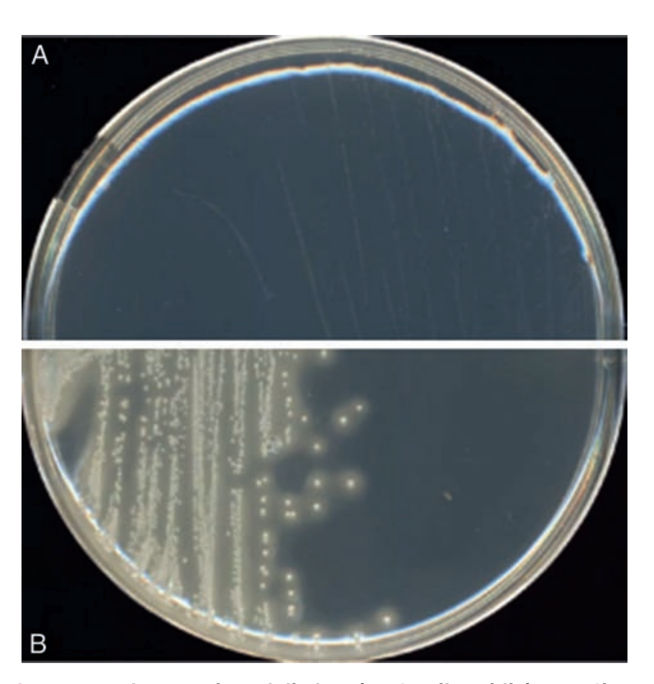


Fig. 32.4 Croissance de *C. jeikeium* (espèce lipophile) sur gélose trypticase-soja sans (A) et avec Tween 80® (1 %). Le milieu contient également du CaCl2 (0,1 %).

Tableau 32.4 Principaux genres bactériens corynéformes autres que *Corynebacterium* impliqués dans les infections humaines.

Genre	Principales espèces	Types d'infections
Arcanobacterium	*A. haemolyticum*	Pharyngite avec rash cutané, infections cutanées
Arthrobacter	*A. cumminsii*, *A. oxydans*	Bactériémies, infections sur matériel, infections urinaires
Brevibacterium	*B. casei*	Bactériémies, infections sur matériel, « pied malodorant »
Cellulomonas	*C. denverensis*	Bactériémies, infections de plaies, cholécystites
Cellulosimicrobium	*C. funkei*, *C. cellulans*	Infections sur matériel, bactériémies
Dermabacter	*D. hominis*	Infections de plaies, bactériémies
Leifsonia	*L. aquatica* (anc. *Corynbacterium auaticum*)	Bactériémies, infections sur matériel
Microbacterium	*M. oxydans*, *M. paraoxydans*, *M. foliorum*, *M. resistens*	Bactériémies, infections sur matériel, infections de plaies
Oerskovia	*O. turbata*	Bactériémies, infections sur matériel, infections de plaies
Rhodococcus	*R. equi*	Infections pulmonaires, abcès cérébraux et sous-cutanés
Rothia	*R. dentocariosa*, *R. mucilaginosa*, *R. aeria*	Endocardites, bactériémies, infections respiratoires
Trueperella	*T. pyogenes*, *T. bernardiae*	Abcès cutanés
Turicella	*T. otitidis*	Otite moyenne aiguë ?

L'identification définitive des corynébactéries au niveau de l'espèce peut être obtenue grâce aux techniques de biologie moléculaire qui restent les méthodes de référence. À noter que le séquençage du gène *rpoB* est plus discriminant que le séquençage du gène de l'ARNr 16S.

À noter qu'une détection par PCR (classique ou en temps réel) du gène de la toxine (*tox*) ou de son répresseur (*dtxR*) est disponible ainsi qu'une PCR mulitplex différenciant les espèces du complexe *diphtheriae*.

Recherche de toxine diphtérique

Une fois le diagnostic d'espèce *C. diphtheriae* porté, il est nécessaire de déterminer le statut toxinique de la souche. La production de toxine est liée à l'état lysogène des souches qui ont intégré dans leur chromosome le phage bêta porteur du gène *tox*. Ainsi, seules les souches *tox* + synthétisent et produisent la toxine.

La recherche de toxine peut être pratiquée selon deux méthodes, toutes les deux réalisées par les CNR ou de rares laboratoires spécialisés :

- recherche in vivo par inoculation au cobaye de Guinée (encadré 32.3) : c'est la technique de référence, qui consiste en l'injection par voie sous-cutanée à un cobaye (rats et souris sont naturellement résistants en raison de l'absence de fixation de la toxine à son récepteur) d'un faible inoculum de *C. diphtheriae* obtenu par culture en milieu solide. Les isolats qui expriment la toxine induisent généralement la mort de l'animal en moins de 36 heures (parfois jusqu'en 5 jours), l'autopsie révélant des œdèmes viscéraux et des hémorragies des surrénales, alors que l'animal protégé par du sérum antidiphtérique survit (Fig. 32.5) ;
- recherche in vitro par le test d'Elek qui est une technique d'immunodiffusion en milieu gélosé (encadré 32.2). Pour être réalisée, deux souches connues *tox* + et *tox* – sont ensemencées sur milieu gélosé parallèlement à la souche étudiée (Fig. 32.6). Les souches doivent avoir été préalablement isolées sur milieu nutritif simple et pas sur gélose au sang, le fer inhibant la production de toxine. On dépose alors perpendiculairement une bandelette imprégnée de sérum antitoxine diphtérique. Puis on observe les arcs de précipitation (Fig. 32.7). Il ne s'agit pas d'une technique rapide, les arcs ne pouvant être visibles qu'après 2 à 6 jours. De plus, il existe des arcs non spécifiques. Si la souche à étudier est toxinogène, l'arc principal rejoint celui observé avec la souche connue *tox* +.

À noter que de nombreuses techniques ont été développées pour la recherche de l'expression de la toxine diphtérique (test de cytotoxicité sur cellules Vero, immuno-empreinte, test d'évaluation de l'activité ADP-ribolysante, agglutination de particules de latex sensibilisées, ELISA, etc.). Aussi, un test rapide (10 à 15 minutes) immunochromatographique (ICS *strip*) détectant la toxine a été développé ; il permet une détection de la toxine sur culture, voire sur prélèvement incubé en bouillon. Ce test a des sensibilités et des spécificités comprises entre 95 et 100 %.

La démarche du diagnostic bactériologique de diphtérie est schématisée sur la figure 32.8.

La recherche du gène codant la toxine diphtérique peut également être réalisée par amplification génique sur souche, voire directement sur produit pathologique. Plusieurs protocoles de PCR en point final ou en temps réel ont été mis au point, ciblant la sous-unité A, la sous-unité B ou la jonction des deux sous-unités du gène *tox*. La majorité des techniques permettent la recherche du gène *tox* chez les trois espèces du complexe *diphtheriae* qui hébergent le même bactériophage. Même si ces techniques sont plus simples et plus rapides (< 8 heures), certaines souches *tox* + peuvent ne pas exprimer la toxine, et donc la production d'une toxine fonctionnelle devra toujours être confirmée.



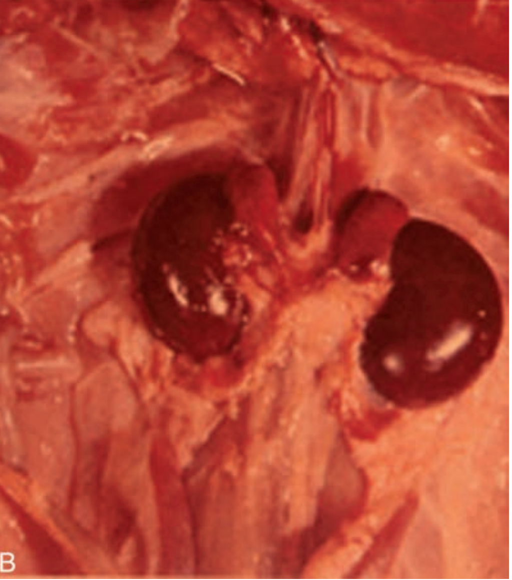


Fig. 32.5 Autopsie de cobaye après inoculation par voie sous-cutanée d'une culture de *C. diphtheriae* toxinogène. À gauche, animal protégé par antisérum (pas d'hémorragie des surrénales). À droite, cobaye non protégé (hémorragie des surrénales).

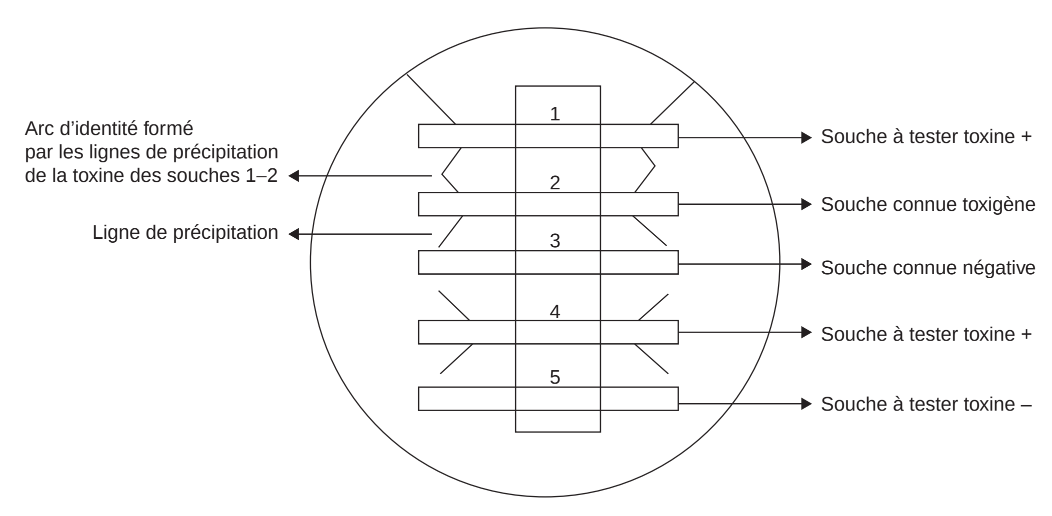


Fig. 32.6 Mise en évidence de la toxinogenèse in vitro par la méthode d'Elek (principe).

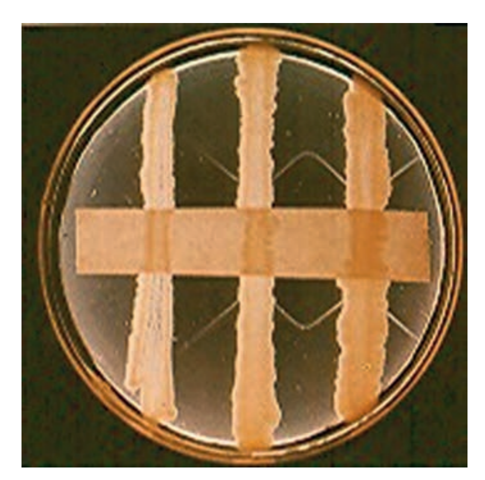


Fig. 32.7 Test d'Elek. De gauche à droite : souche de référence toxine–, souche à tester toxine +, souche de référence connue toxine +.

Sensibilité aux antibiotiques et traitement

Selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST 2015, l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des corynébactéries est réalisable par antibiogramme sur Mueller-Hinton additionné de 5 % de sang de cheval défibriné et de 20 mg/l de β-NAD (www.sfm-microbiologie.org). Un inoculum équivalent à 0,5 McFarland doit être appliqué par écouvillonnage à la surface de la gélose. Les boîtes doivent être incubées sous 5 % de CO_2 à 35 ± 2 °C pendant 20 ± 4 heures. Des concentrations critiques sont disponibles pour 10 antibiotiques (pénicilline G, ciprofloxacine, moxifloxacine, gentamicine, clindamycine, tétracycline, rifampicine, vancomycine, linézolide et cotrimoxazole).

La sensibilité des corynébactéries aux antibiotiques est très variable et diffère selon les espèces et les antibiotiques concernés. En fonction de la sensibilité aux β-lactamines, ces bactéries peuvent être classées en trois groupes : le premier groupe comprend les souches résistantes à haut niveau (*C. jeikeium*, *C. urealyticum*, *C. amycolatum* [10–40 %]) ; le deuxième groupe est constitué de souches avec une sensibilité diminuée (*C. aurimucosum*, *C. auris*, *C. diphtheriae*, *C. minutissimum*, *C. resistens*, *C. striatum*, *Brevibacterium* spp. et *D. hominis*) ; et le troisième groupe avec les souches très sensibles (*C. accolens*, CDC group F-1, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. glucuronolyticum*, *C. macginleyi*, *T. otitidis*, *R. dentocariosa*, *L. aquatica*, *Arcanobacterium* spp. et *Microbacterium* spp.).

La plupart des corynébactéries sont naturellement sensibles aux aminosides, aux fluoroquinolones, aux macrolides-lincosamides-streptogramines, aux tétracyclines et à la rifampicine. Cependant, des souches résistantes à toutes ces familles d'antibiotiques ont été décrites. Les corynébactéries sont constamment sensibles au linézolide et aux glycopeptides, excepté l'espèce *M. resistens* qui est naturellement résistante à bas niveau à la vancomycine. Récemment, un intégron portant une résistance au triméthoprime–sulfaméthoxazole a été mis en évidence sur une souche de *C. diphtheriae.*

Le traitement curatif de la diphtérie repose sur une antibiothérapie généralement par voie orale (amoxicilline 1 g 3 fois/jours, 15 jours ; azithromycine 500 mg 1 fois/jour, 5 jours ; clarithromycine 500 mg 2 fois/jour, 15 jours) et une sérothérapie débutée en urgence. Il est difficile de se procurer ces antisérums.

Le traitement des infections dues aux autres corynébactéries repose généralement sur l'utilisation des pénicillines, sauf pour les espèces multirésistantes (par exemple *C. jeikeium*, *C. urealyticum*) pour lesquelles la vancomycine est nécessaire. La pristinamycine et la tétracycline constituent des alternatives thérapeutiques. Pour les infections dues à *R. equi*, l'association érythromycine-rifampicine est souvent utilisée.

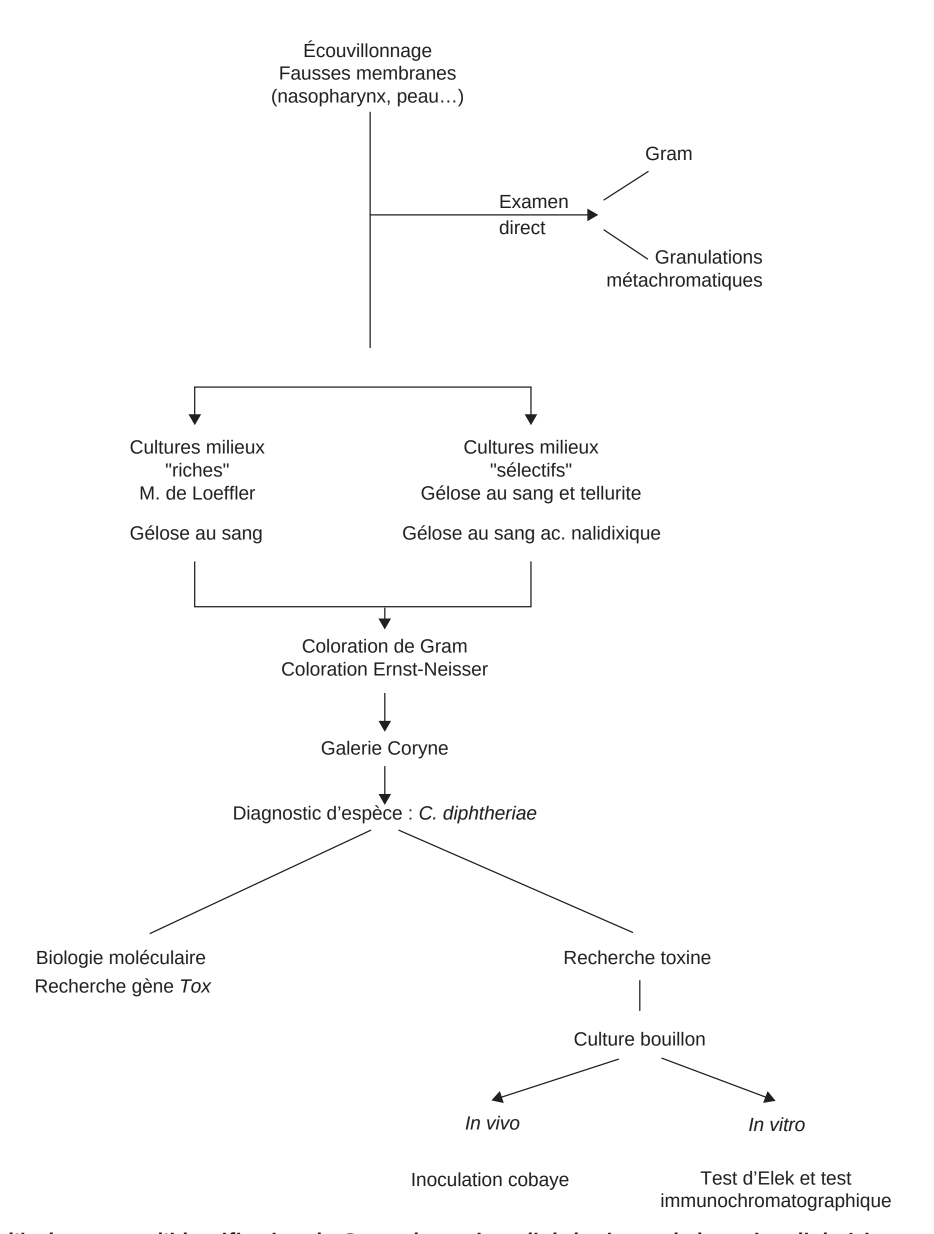


Fig. 32.8 Méthodes d'isolement et d'identification de *Corynebacterium diphtheriae* et de la toxine diphtérique.

Encadré 32.1 Coloration des granulations métachromatiques

On utilise plusieurs solutions.

- Solution A :
  - bleu de méthylène 1,0 g ;
  - éthanol 96 % 20,0 ml ;
  - eau distillée 952,0 ml ;
  - CH_3 COOH pureté >95 % (acide glacial) 50,0 ml.
- Solution B :
  - cristal violet 1,0 g ;
  - éthanol 96 % 10,0 ml ;
  - eau distillée 300,0 ml.

Mélanger avant usage les deux solutions à raison de 2 volumes de A et 1 volume de B.

- Solution C :
  - solution de lugol 100,0 ml ;
  - CH3 CHOH COOH (acide lactique) concentré 1,0 ml.
- Contre-coloration
  - chrysoïdine 2,0 g ;
  - eau distillée 300,0 ml ;
- Dissoudre par chauffage à 100 °C.

Technique de coloration : la lame préalablement fixée est recouverte du mélange A + B et chauffée 20 à 30 secondes. Après lavage à l'eau froide, la solution C est déposée et laissée 5 secondes.

On procède à une contre-coloration durant 5 minutes.

Les lames sont alors séchées et l'examen se fait sous immersion. Les granulations apparaissent en noir alors que le corps bactérien apparaît en brun.

Encadré 32.2 **Recherche immunologique de toxine diphtérique : test d'Elek**

- Souches de référence à utiliser :
  - témoin positif (souche toxinogène) : *C. diphtheriae* CIP A102 ;
  - témoin négatif (souche non toxinogène) : *C diphtheriae* CIP 780.2.
- Milieu de base 1 :
  - protéose peptone n° 3 (Difco) 3 g ;
  - maltose 0,6 g ;
  - acide lactique 0,14 ml ;
  - eau distillée 100 ml.
- Milieu de base 2 :
  - agar 3 g ;
  - chlorure de sodium 1 g ;
  - eau distillée 100 g.

Les deux milieux sont chauffés par dissolution complète des composés, ajustés à pH 7,8, puis mélangés, répartis dans des tubes de 15 ml et stérilisés.

Faire fondre un tube contenant le milieu de base, ramener à la température de 55 °C et couler en boîte de Petri. Déposer au milieu de la boîte de gélose encore molle une bandelette de papier Whatmann imbibée de sérum antidiphtérique à 1000 UI/ml (Pasteur vaccins). Sécher la surface en incubant 20 minutes à 37 °C. Effectuer trois stries correspondant à la souche à tester et aux deux souches témoins perpendiculairement à la bandelette. Observer après 24 heures d'incubation à 37 °C et le cas échéant à 48 heures voire plus la présence d'arcs de précipitations débutant à partir des cultures en stries, et comparer la position de ces arcs par rapport à ceux de la souche témoin positive.

Il existe une variante de ce test dans laquelle l'antitoxine est déposée dans un puits central de la gélose et les souches à tester sont disposées en rosette autour de puits.

Encadré 32.3 **Recherche de la toxine diphtérique sur cobaye**

On réalise une suspension riche à partir d'une culture de 24 heures sur milieu solide (Loeffler ou autre) dans 12 ml de bouillon (ne pas utiliser une suspension en solution saline), ou utiliser une culture de 24 à 48 heures de la souche suspecte en bouillon, avec une densité suffisante (densité 3 de MacFarland).

Prendre deux cobayes :

- l'un des deux reçoit une injection intrapéritonéale de 1000 à 2000 UI de sérum antidiphtérique 2 à 3 heures avant le test ;
- l'autre est non protégé.

Tous deux reçoivent par voie sous-cutanée 2 à 3 ml de la suspension ou du bouillon.

En cas de souche toxigène, le cobaye non immunisé meurt en 1 à 2 jours alors que le cobaye immunisé survit. À l'autopsie, l'animal décédé, du fait de la toxine, présente des hémorragies des surrénales. Il faut savoir qu'avec certaines souches de *C. ulcerans* ou de *C. pseudotuberculosis* l'animal « protégé » peut aussi mourir du fait d'autres toxines.

Pour en savoir plus

Alatoom AA, Cazanave CJ, Cunningham SA, et al. Identification of non-diphtheriae Corynebacterium by use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2012 ; 50 : 160–3.

Avril JL, Dabernat H, Denis F, et al. Corynebacterium. In : Bactériologie clinique. 2000. Paris : Ellipses ; 2000. p. 122–39.

Barberis C, Almuzara M, Join-Lambert O, et al. Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry and conventional phenotypic methods for identification of Gram-positive rods. PLoS One 2014 ; 9 : e106303.

Bernard K. The genus Corynebacterium and other medically relevant coryneform-like bacteria. J Clin Microbiol 2012 ; 50 : 3152–8.

Engler KH, Efstratiou A, Norn D, et al. Immunochromatographic strip test for rapid detection of diphtheria toxin : description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of diphtheria. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 80–3.

Farfour E, Leto J, Barritault KM, et al. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. J Clin Microbiol 2012 ; 50 : 2702–7.

Funke G. Clinical microbiology of coryneform bacteria. Clin Microbiol Rev 1997 ; 10 : 125–59.

Funke G, Bernard KA. Coryneform Gram-positive rods. In : Manual of clinical microbiology. 11th ed. Washington DC : ASM Press ; 2015.

Haut conseil de la santé publique. Conduite à tenir lors de l'apparition d'un cas de diphtérie. 2011. Accessible sur le site, www.sante.gouv.fr.

Khamis A, Raoult D, La Scola B. rpoB gene sequencing for identification of Corynebacterium species. J Clin Microbiol 2004 ; 42 : 3925–31.

Konrad R, Berger A, Huber I, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic Corynebacterium species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria. Euro Surveill 2010 ; 15 : 19699.

MacGregor RR. Corynebacterium diphtheriae. In : Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Churchill Livingston ; 2010.

Meyer DK, Reboli AC. Other coryneform bacteria and rhodococci. In : Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Philadelphia : Churchill Livingston ; 2010.

Nakao H, Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheriae toxin genes. J Clin Microb 1997 ; 35 : 1651–5.

Navas M, Pincus DH, Wilkey K, et al. Identification of aerobic Gram-positive bacilli by use of Vitek MS. J Clin Microbiol 2014 ; 52 : 1274–7.

Nhan TX, Parienti JJ, Badiou G, et al. Microbiological investigation and clinical significance of Corynebacterium spp. in respiratory specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2012 ; 74 : 236–41.

Patey O, Bimet F, Riegel P, et al. Clinical and molecular study of Corynebacterium diphtheriae systemic infections in France. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 441–5.

Riegel P. Corynebacterium et bactéries apparentées. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. 2e ed. Paris : ESKA ; 2007. p. 1227–50.

Riegel P. Corynebactéries. In : Courvalin P, Leclercq R, editors. Antibiogramme. 3e éd. Paris : ESKA ; 2011. p. 429–37 Chap 32.

32.2 *Erysipelothrix rhusiopathiae* ou bacille du rouget du porc

J. Tankovic, V. Cattoir

Le genre *Erysipelothrix* compte trois espèces, *E. rhusiopathiae* (1918), *E. tonsillarum* (1987) et *E. inopinata* (2004); ces deux dernières n'étant pas pathogènes pour l'homme, le chapitre ne traitera que d'*E. rhusiopathiae*.

Caractères généraux

E. rhusiopathiae est un bacille à Gram positif aérobie-anaérobie facultatif, non sporulé, immobile et non acidorésistant. Il se présente sous forme de bacilles fins (0,2–0,5 µm de large sur 0,8–2,5 µm de long), droits ou très légèrement incurvés, seuls ou regroupés en diplocoques, en courtes chaînettes ou en « lettres chinoises », voire sous forme de longs filaments non branchés. À noter qu'*E. rhusiopathiae* est facilement décolorable, et qu'il peut donc apparaître sous forme de bacilles à Gram négatif. Il cultive entre 5 et 42 °C et en présence de fortes concentrations de NaCl (jusqu'à 8,5 %). Les réactions de catalase et d'oxydase sont négatives.

Habitat et pouvoir pathogène

E. rhusiopathiae, bactérie très largement répandue dans la nature, est un agent pathogène responsable de zoonoses avec un spectre d'espèces sensibles très large, notamment mammifères, oiseaux, poissons et crustacés. Mais le portage sain existe aussi. *E. rhusiopathiae* est fréquemment présent dans le tube digestif de porcs sains, qui constituent le principal réservoir. Cette bactérie est aussi souvent retrouvée chez les moutons, les lapins, les bovins et les dindes, tandis qu'elle est très répandue dans l'environnement (sol, eaux, plantes, aliments, etc.). Cela s'explique par une contamination de ces milieux par des animaux infectés ou colonisés et par la capacité de persistance prolongée de cette bactérie dans l'environnement.

E. rhusiopathiae n'est pas un pathogène obligatoire mais peut accidentellement être transmis à l'homme après contact avec des animaux malades ou porteurs. La maladie humaine est donc essentiellement une maladie professionnelle (vétérinaires, agriculteurs, bouchers, poissonniers, pêcheurs, cuisiniers, ménagères, etc.). À noter qu'il n'y a pas de transmission interhumaine.

Trois formes cliniques principales sont distinguées. La forme cutanée bénigne appelée « érysipéloïde de Rosenbach » est la plus fréquente. Il s'agit d'une cellulite (incubation de 2 à 7 jours) touchant le plus souvent les mains et les doigts. La forme cutanée diffuse avec symptômes généraux plus fréquents est d'évolution plus sévère. La forme la plus grave est la bactériémie qui est souvent associée à une endocardite de mauvais pronostic. À noter que, chez les sujets atteints d'endocardite, un érysipéloïde n'est observé que dans la moitié des cas. Les bactériémies sans endocardite existent mais sont exceptionnelles.

Diagnostic bactériologique

La mise en évidence de la bactérie à partir de l'érysipéloïde est difficile. S'il existe des phlyctènes, il faut prélever le liquide. Sinon, il faut injecter et réaspirer 1 ml de sérum physiologique ou pratiquer une biopsie cutanée en périphérie de la lésion. Cette bactérie n'est pas fragile et elle est facilement détectée par les systèmes automatisés d'hémocultures.

Elle ne présente pas de grandes exigences et cultive sur gélose au sang frais ou cuit. Elle est aéro-anaérobie, mais la primoculture est favorisée par une incubation en atmosphère enrichie avec 5 % de CO_2. Son optimum thermique se situe entre 30 et 37 °C.

La croissance est relativement lente en primoculture et les colonies ne sont bien visibles qu'après 2 à 3 jours d'incubation. Sur gélose au sang, une α-hémolyse plus ou moins intense peut s'observer, mais jamais de β-hémolyse. Après 48 heures d'incubation, deux types de colonies peuvent s'observer sur les isolements : des colonies *smooth* (S) et *rough* (R). Les colonies S sont petites, convexes, circulaires et transparentes, tandis que les colonies R sont plus grandes, plus plates, plus opaques et à contour irrégulier.

L'activité métabolique de cette bactérie est faible et son caractère biochimique principal est la production d'H_2S en 48 heures sur milieu de Kligler-Hajna ou milieu au sous-acétate de plomb. C'est le seul bacille à Gram positif aéro-anaérobie qui présente cette caractéristique. Un autre caractère biochimique important est la présence quasi constante d'une coagulase libre que l'on recherchera de la même manière que pour l'identification de *Staphylococcus aureus*.

L'identification peut se faire grâce aux systèmes automatisés de type Vitek 2® (bioMérieux) ou Phoenix® (Becton Dickinson) ou à la galerie biochimique API Coryne® (bioMérieux). Enfin, *E. rhusiopathiae* semble pouvoir être identifié de manière fiable grâce à la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Sensibilité aux antibiotiques

La pénicilline G est très active sur cette bactérie (CMI de 0,0025 à 0,06 mg/l) et est bactéricide. *E. rhusiopathiae* est également très sensible aux céphalosporines de troisième génération comme le céfotaxime ou la ceftriaxone. Une bonne sensibilité à la ciprofloxacine a aussi été rapportée. Ce germe est également sensible aux macrolides et lincosamides ainsi qu'aux tétracyclines.

En revanche, il est naturellement résistant aux aminosides, aux glycopeptides, aux sulfamides et au triméthoprime.

Aucune résistance aux β-lactamines n'a été décrite, tandis qu'une résistance acquise aux macrolides et lincosamides et aux tétracyclines a été rapportée.

Le traitement de l'endocardite à *E. rhusiopathiae* repose sur la pénicilline G à fortes doses (12 à 20 MUI/j en IV) sur une durée de 4 à 6 semaines. Les céphalosporines de troisième génération et les fluoroquinolones constituent une alternative, mais pas les macrolides et les lincosamides qui ne sont que bactériostatiques.

Pour en savoir plus

Brooke CJ, Riley TV. Erysipelothrix rhusiopathiae : bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. J Med Microbiol 1999 ; 48 : 789–99.
Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. Clin Microbiol Rev 2001 ; 14 : 177–207.
Farfour E, Leto J, Barritault KM, et al. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. J Clin Microbiol 2012 ; 50 : 2702–7.
Nassar IM, De La Llana R, Garrido P, et al. Mitro-aortic infective endocarditis produced by Erysipelothrix rhusiopathiae : case report and review of the literature. J Heart Valve Dis 2005 ; 14 : 320–4.
Reboli AC, Farrar WE. Erysipelothrix rhusiopathiae : an occupational pathogen. Clin Microbiol Rev 1989 ; 2 : 354–9.
Reboli AC. Erysipelotrix rhusiopathiae. In : Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Philadelphia : Churchill Livingston ; 2010.
Renaud F, Bille J, Hansen W. Erysipelothrix. In : Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2005.
Tankovic J. Bactéries lactiques et Erysipelothrix. In : Antibiogramme. 3e ed. Paris : ESKA ; 2012.
Wellinghausen N. Listeria and Erysipelothrix. In : Manual of clinical microbiology. 11th ed. Washington DC : ASM Press ; 2015.

32.3 *Lactobacillus*

J. Tankovic, V. Cattoir

Caractères principaux

Les lactobacilles sont des bacilles à Gram positif immobiles et non sporulés, souvent regroupés en chaînettes. Leur longueur est variable, allant de bacilles longs et fins à des formes coccobacillaires. Comme les *Streptococcaceae*, ils font partie des bactéries lactiques. Celles-ci se définissent comme des bactéries à Gram positif aéro-anaérobies utilisant les hydrates de carbone comme principale source d'énergie, le produit de ce métabolisme étant uniquement ou majoritairement l'acide lactique.

Le métabolisme énergétique des *Lactobacillus* est exclusivement fermentaire et ce genre bactérien est classiquement subdivisé en trois groupes selon les voies de fermentation (Tableau 32.5).

La biologie moléculaire a aussi permis de mieux appréhender la grande diversité de ce genre bactérien, avec 214 espèces recensées en 2015 (www.bacterio.cict.fr).

Habitat et pouvoir pathogène

Les lactobacilles sont largement répandus dans la nature, essentiellement au niveau des végétaux, et on les retrouve donc naturellement dans les aliments. Ils sont de plus largement utilisés dans l'industrie alimentaire en tant que ferments. Mais certaines espèces peuvent au contraire gâter la qualité des aliments ou des boissons. Ils sont également utilisés en tant que probiotiques dans l'alimentation animale et dans l'industrie pharmaceutique.

On les retrouve aussi comme commensaux chez l'animal et l'homme, surtout au niveau de la partie supérieure du tractus digestif (cavité buccale mais aussi de l'iléon et du vagin (flore de Döderlein).

Ces bactéries sont des pathogènes opportunistes rares mais qui causent des infections sévères, notamment chez les patients immunodéprimés : endocardite le plus fréquemment, bactériémie, abcès souvent polymicrobien. *L. rhamnosus* et *L. casei* sont les espèces les plus fréquemment impliquées (environ un tiers des cas). Les autres espèces, que l'on peut identifier de façon non exceptionnelle, sont *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. plantarum* et *L. ultunensis*. À noter aussi que l'espèce *L. delbrueckii* est un possible uropathogène émergent, notamment chez les personnes âgées.

Tableau 32.5 **Répartition des espèces de *Lactobacillus* selon les voies de fermentation**

Groupes	I	II	III
Voie de fermentation	Homofermentaire strict	Hétérofermentaire facultatif	Héterofermentaire strict
Production de gaz carbonique	–	+/–	+
Culture à 45 °C	+	–	–
Culture à 15 °C	–	+	+
Résistance naturelle aux glycopeptides	Non	Oui	Oui
Principales espèces	*L. acidophilus* *L. amylovorus* *L. crispatus* *L. delbrueckii* *L. gasseri* *L. helveticus* *L. salivarius* *L. ultunensis*	*L. casei* *L. curvatus* *L. paracasei* *L. pentosus* *L. plantarum* *L. rhamnosus*	*L. brevis* *L. cellobiosus* *L. confusus* *L. fermentum* *L. reuteri* *L. vaginalis*

Diagnostic bactériologique

La grande majorité des souches sont anaérobies aérotolérantes, même si 20 % des isolats humains présentent un métabolisme anaérobie strict. Les atmosphères de culture à utiliser pour leur croissance sont donc l'anaérobiose et/ou l'air enrichi de 5 ou 10 % de CO_2. L'optimum thermique de la plupart des espèces est de 37 °C. Leur métabolisme exclusivement fermentaire fait que leur culture s'accompagne d'une forte acidification à laquelle ils sont bien adaptés : le pH optimal de croissance de la plupart des espèces est de 5,5.

Leurs besoins nutritionnels sont très complexes. Le milieu le plus adapté à leur culture est le milieu de Man, Rogosa et Sharpe (MRS ; Encadré 32.4). Sur ce milieu, les colonies se développent en 24 à 48 heures, sont incolores ou blanchâtres et crémeuses ou granuleuses. Mais les lactobacilles cultivent également, bien que plus difficilement, sur gélose enrichie en sang frais ou cuit (Fig. 32.9).

Encadré 32.4 **Milieu MRS**

Constitution du milieu MRS pour 1 litre :

- Glucose : 20 g
- Peptone trypsique de caséine : 15 g
- Extrait de viande : 5 g
- Acétate de sodium : 5 g
- Phosphate bipotassique : 2,4 g
- Citrate d'ammonium (diammonique) : 2 g
- Tween 80® : 1 ml
- Sulfate de magnésium : 0,2 g
- Sulfate de manganèse : 0,05 g

Ce milieu peut être gélosé (15 g pour 1 l).
Le pH final est de 6,4.
Autoclaver 20 minutes à 120 °C.

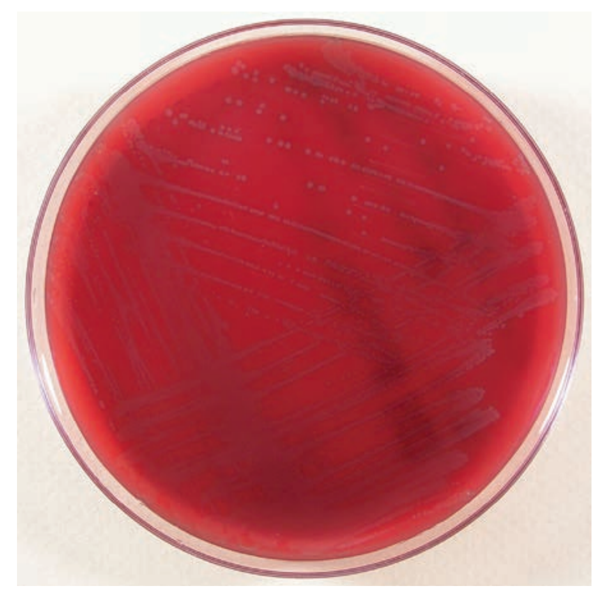


Fig. 32.9 Aspect des colonies de *Lactobacillus* sur gélose au sang.

Même si les lactobacilles sont dépourvus d'activité catalasique, certaines souches de *L. casei* et de *L. plantarum* peuvent synthétiser une catalase sur milieu au sang ou présenter une activité catalasique d'origine non cytochromique. La réaction de l'oxydase est également négative.

Le diagnostic d'espèce peut être difficile à faire avec les méthodes biochimiques en raison du très grand nombre d'espèces existantes. Il repose essentiellement sur des tests de fermentation des sucres. La galerie API 50CH® (bioMérieux) avec utilisation du milieu pour lactobacilles était la méthode biochimique la plus utilisée. La biologie moléculaire (par exemple séquençage du gène de l'ARNr 16S) reste certainement la technique la plus précise, mais la spectrométrie de masse MALDI-TOF semble également très fiable pour l'identification des lactobacilles au niveau de l'espèce.

Sensibilité aux antibiotiques

Les espèces hétérofermentaires sont naturellement résistantes à haut niveau aux glycopeptides. En revanche, les espèces homofermentaires sont sensibles. Les lactobacilles sont par ailleurs naturellement résistants à la fosfomycine, à l'acide fusidique, à l'association triméthoprime–sulfaméthoxazole et au métronidazole.

Ils sont modérément sensibles à la pénicilline G, à l'amoxicilline et à l'imipénème avec absence d'effet bactéricide, et peu sensibles aux céphalosporines. La gentamicine et la nétilmicine ont une activité modérée qui est cependant nettement meilleure que celle sur les streptocoques-entérocoques. Une synergie bactéricide β-lactamines–aminoside a été démontrée in vitro et in vivo chez l'animal.

Les macrolides et la clindamycine sont très actifs, mais une résistance acquise est possible, bien que rare. Les fluoroquinolones telles que la ciprofloxacine ou la lévofloxacine ont une activité modérée ; la moxifloxacine est plus efficace.

En ce qui concerne les nouvelles molécules, la daptomycine présente une bonne activité, mais des souches ayant une sensibilité diminuée ont été décrites. L'activité du linézolide était bonne dans une étude (CMI_{50} à 1 mg/l), mais dans un autre travail les CMI étaient plus élevées (CMI_{50} à 4–8 mg/l).

Le traitement recommandé est l'association pénicilline G ou amoxicilline à fortes doses (> 25 MU/j pour la pénicilline G, 200–250 mg/kg/j pour l'amoxicilline) + aminoside (habituellement la gentamicine).

Pour en savoir plus

Cannon J, Lee T, Bolanos J, et al. Pathogenic relevance of Lactobacillus : a retrospective review of over 200 cases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005 ; 24 : 31–40.

Darbro BW, Petroelje BK, Doern GV. Lactobacillus delbrueckii as the cause of urinary tract infection. J Clin Microbiol 2009 ; 47 : 275–7.

De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for cultivation of lactobacilli. J Appl Bacteriol 1960 ; 23 : 130–8.

Farfour E, Leto J, Barritault KM, et al. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. J Clin Microbiol 2012 ; 50 : 2702–7.

Goldstein EJC, Citron DM, Merriam V, et al. Comparative in vitro activities of XRP 2868, pristinamycin, quinupristin-dalfopristin, vancomycin, daptomycin, linezolid, clarithromycin, telithromycin, clindamycin, and ampicillin against anaerobic gram-positive species, actinomycetes, and lactobacilli. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49 : 408–13.
Hall V, Copsey SD. Propionibacterium, Lactobacillus, Actinomyces, and other non-spore-forming anaerobic Gram-positive rods. In : Manual of clinical microbiology. 11th ed Washington DC : ASM Press; 2015.
Lepargneur JP. Lactobacillus. In : Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA; 2007.
Salminen M, Tynkkynen S, Rautelin H, et al. Lactobacillus bacteremia : clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic L. rhamnosus GG. Clin Infect Dis 2004; 38 : 62–9.
Tankovic J. Bactéries lactiques et Erysipelothrix. In : Antibiogramme. 3e éd Paris : ESKA; 2012.
Tannock G. A special fondness for lactobacilli. Appl Environ Microbiol 2004; 70 : 3189–94.

32.4 *Listeria*

F. Denis, F. Garnier, M.-C. Ploy

Les *Listeria* sont des petits bacilles à Gram positif non sporulés, mobiles.

Listeria monocytogenes est responsable de la listériose qui est une saprozoonose.

Classification

La taxonomie moderne montre que le genre *Listeria* est sans relation avec celui des *Corynebacterium*, mais qu'il appartient à la branche des *Clostridium* à côté des *Staphylococcus, Streptococcus, Lactobacillus.*

Le genre *Listeria* comprend actuellement six espèces : *L. monocytogenes* (la seule pathogène à la fois pour l'homme et l'animal), et des espèces génotypiquement apparentées, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*. Pour *L. grayi* ainsi que *L. murrayi*, avec laquelle elle a été récemment regroupée, un genre distinct, *Murraya*, a été proposé.

Habitat et pouvoir pathogène

Habitat

L. monocytogenes est une bactérie saprophyte et ubiquitaire. Elle est très répandue au niveau du sol, des eaux, des végétaux et se retrouve dans les matières fécales de mammifères sains (homme et nombreuses espèces animales). Cette espèce est retrouvée dans des aliments d'origine animale (lait, viande, charcuterie, poissons, fromages, etc.) ou d'origine végétale (crudités, choux, etc.). C'est une bactérie très résistante dans le milieu extérieur pouvant survivre 1 à 2 ans. De plus, elle peut se multiplier à +4 °C (donc dans les réfrigérateurs) et survivre plusieurs années au froid.

Les concentrations de *L. monocytogenes* peuvent atteindre 100 à 1000 UFC/g de viande et même 10 000 000 UFC/g pour les fromages. La contamination de l'aliment peut survenir à n'importe quelle étape de sa production (matière première, transformation, distribution), mais aussi chez le consommateur dans le réfrigérateur.

Épidémiologie (Tableau 32.6)

La contamination de l'homme est rarement directe au contact d'animaux infectés ou interhumaine; elle est pratiquement toujours indirecte, liée à l'ingestion d'aliments contaminés.

L'incidence des infections va, en France, selon les années, de 3,8 à 7,9 par million d'habitants.

Le terrain (grossesse, immunodépression, âge) joue un rôle important dans le développement d'une maladie; dans la vie quotidienne, les expositions sont très fréquentes, sans conséquence pour les sujets sains (on estime à 1 à 20 % les porteurs sains).

Les cas de listériose humaine surviennent soit de façon sporadique, soit sous forme d'épidémies, parfois à grande échelle. Ainsi, en 1992, une épidémie en France à partir de la consommation de langue de porc en gelée a rassemblé 279 cas.

Des cas d'infections nosocomiales ont aussi été rapportés, notamment dans les maternités, et sont le plus souvent la conséquence du non-respect des règles d'hygiène.

Les listérioses font l'objet d'une surveillance à différents niveaux : nationaux, européens et internationaux.

En France, la listériose est une maladie à déclaration obligatoire. Les souches isolées doivent être transmises au Centre national de référence (CNR) localisé à l'Institut Pasteur à Paris.

Le dépassement de seuil est défini par la survenue de 3 cas de listériose sur 6 semaines dus à des souches de même groupe par PCR et de pulsotypes rares ou fréquemment similaires.

Tout dépassement de seuil est suivi d'une phase de surveillance renforcée. La cellule *Listeria* peut décider du passage en phase alerte définie comme toute situation présentant une menace potentielle par la santé publique.

En 2013, le nombre de souches humaines reçues par le CNR était de 368 et en progression de 7 %; cette augmentation concerne essentiellement les formes neuroméningées.

Pouvoir pathogène et physiologie

La listériose se manifeste sous différentes formes.

- La **forme maternofœtale** regroupe selon les années entre 20 et 50 % des cas. La femme enceinte peut présenter, en cours de grossesse, une maladie initialement discrète

Tableau 32.6 **Principaux syndromes cliniques associés à *Listeria monocytogenes* (selon Schlech).**

Méningites néonatales
Méningoencéphalites de l'adulte
Rhombencéphalites
Bactériémies enfants et adultes
Endocardites primitives ou sur prothèse
Péritonite spontanée
Pneumonies
Ostéomyélites
Hépatites
Abcès hépatiques
Infections cutanées (contact avec animaux)
Endophtalmies
Gastroentérites fébriles
Péritonites sur dialyse péritonéale
Arthrites septiques

pseudogrippale avec parfois des hémocultures positives; cet épisode peut être spontanément résolutif ou guéri par une antibiothérapie non spécifique. Chez la femme enceinte, l'infection a toujours lieu au cours des deux premiers trimestres de la grossesse. La plupart des listérioses sont décrites après le 5e mois de grossesse. Avant le 5e mois de grossesse, l'infection peut entraîner un avortement; plus tardivement, elle peut être à l'origine d'un accouchement prématuré. Le fœtus s'infecte soit in utero par voie sanguine (90 % des cas), soit lors du passage de la filière génitale (< 10 % des cas). La listériose néonatale peut se manifester sous forme d'une infection précoce consécutive à une infection in utero avec souvent rupture prématurée des membranes. Des manifestations peuvent survenir dans les cinq premiers jours de vie, mais peuvent aussi débuter dès les premières heures de vie. L'enfant peut présenter une forme septicémique voire méningée, plus rarement localisée (pulmonaire, conjonctivale). Les formes généralisées constituent le gravissime tableau polyviscéral dit *granulomatosis infanti septica* dans lequel la phase septicémique peut être associée à une éruption maculopapuleuse. En l'absence de traitement, cette forme septicémique grave est rapidement mortelle. Dans certains cas, les manifestations sont différées 18 à 60 jours après l'accouchement, à type notamment de méningite, l'enfant étant en contact avec les *Listeria* lors de son passage dans la filière génitale maternelle. Des séquelles à type d'hydrocéphalie sont possibles.

- La **forme de l'adulte** concerne souvent, mais pas toujours, des sujets débilités (hémopathies, cancers, traitements immunosuppresseurs, diabétiques, dialysés). Il s'agit le plus souvent de septicémies, de méningites ou méningo-encéphalites.

Des formes localisées, beaucoup plus rares, ont été observées : atteintes oculaires, cutanées, urinaires, etc., mais aussi des endocardites et ostéomyélites pour lesquelles le diagnostic n'est évoqué que devant l'isolement de *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes est une bactérie intracellulaire facultative. Après ingestion de l'aliment contaminé, les bactéries à partir de l'intestin vont gagner les ganglions lymphatiques puis la circulation sanguine. Les bactéries se multiplient dans la rate et le foie, mais l'immunocompétent fait généralement une infection asymptomatique.

Si l'inoculum est lourd ou chez des patients fragilisés (femme enceinte, immunodéprimés, cirrhoses, etc.), ou génétiquement prédisposés, le système immunitaire ne contrôle pas l'infection; les bactéries vont être libérées dans le sang et vont se multiplier préférentiellement dans le placenta ou le système nerveux central.

Quelle que soit la forme clinique, la mortalité est de 20 à 30 %.

Diagnostic bactériologique

Diagnostic direct

Prélèvements

Des hémocultures doivent être systématiquement pratiquées en cours de grossesse devant toute suspicion d'infection.

Chez le nouveau-né, liquide gastrique et méconium sont prélevés dans le cadre d'un dépistage. En cas de suspicion clinique d'infection, une ponction lombaire et des hémocultures, prélèvements pharyngés, conjonctivaux et cutanés sont pratiqués.

Chez la mère, les prélèvements concernent lochies, liquide amniotique, placenta. Le prélèvement vaginal ne montre une culture positive à *Listeria* que dans les quelques jours entourant l'accouchement.

L'examen du placenta peut parfois montrer macroscopiquement des nodules listériens. Dans les méningites, on observe généralement une cytologie modérée : 100 à 500 éléments/mm^3 avec une formule panachée polynucléaires-lymphocytes qui doit faire suspecter *L. monocytogenes* même en l'absence d'examen direct évocateur. Il est possible d'observer des méningites listériennes à liquide clair (20 à 30 éléments/mm^3), mais aussi des méningites purulentes à prédominance de polynucléaires neutrophiles.

Différents prélèvements de lésions cutanées, urines, voire LCR, hémocultures permettent l'isolement non attendu de *L. monocytogenes*. La recherche dans les selles est rarement pratiquée. La recherche dans les aliments est réalisée par les laboratoires vétérinaires.

Transport

Il n'y a pas d'exigence particulière, la bactérie étant résistante. Le prélèvement, s'il n'est pas à traiter en urgence, peut être stocké à + 4 °C avant ensemencement.

Examen direct

L. monocytogenes est un petit bacille à Gram positif (0,5 à 1,2 µm); il peut être isolé ou en courtes chaînettes (Fig. 32.10). Des formes plus longues et des amas voire des aspects en palissade peuvent se voir dans les cultures, pouvant les faire confondre avec des corynébacteries.

Les LCR sont généralement paucibacillaires et les bactéries peuvent être intra- ou extracellulaires.

Culture

L. monocytogenes cultive bien sur milieux usuels, la croissance étant favorisée par l'addition de sérum (1 %) ou de sang (5 %).



Fig. 32.10 Image de *Listeria* en microscopie à balayage.

La croissance est obtenue en aérobiose, voire en atmosphère microaérophile. Les milieux sont généralement placés à 37 °C, mais des enrichissements en bouillon laissés à 4 °C ont été proposés sans que le gain soit flagrant.

Pour la culture, on tentera l'ensemencement direct de :

- **milieux nutritifs** où la croissance est généralement observée après 18 heures à 37 °C. On utilise une gélose trypticase-soja sur laquelle on observe des petites colonies, translucides qui présentent une iridescence bleu-vert en lumière oblique ou une gélose au sang (mouton, cheval, etc.) permettant en outre d'observer une étroite zone d'hémolyse rendue visible en déplaçant la colonie ou potentialisée par le CAMP-test. Le CAMP-test est réalisé en utilisant une gélose trypticase, soja contenant 5 % d'hématies de mouton, en pratiquant à la surface des stries perpendiculaires de la souche de *Listeria* et d'une souche de *Staphylococcus aureus* (CIP 5710) ou de *Rhodococcus equi* (CIP 5869). L'hémolyse est accentuée autour de la souche de *S. aureus* et *L. monocytogenes* et autour de la souche de *R. equi* pour *L. ivanovii* ;
- **milieux sélectifs :** on peut utiliser des géloses au sang rendues sélectives par l'addition de colistine ou d'acide nalidixique, de chlorure de lithium et/ou de cycloheximide. À noter que la culture est possible sur milieux hostiles (hypersalés, biliés) ou sur gélose de MacConkey. Depuis peu, des milieux utilisant des substrats chromogènes (CHE-glucoside) avec du gluconate ferreux permettent de détecter les colonies de *L. monocytogenes* produisant un pigment noir, ou bien on utilise la détection de β-glucosidase ou de phospholipase C. Différents milieux chromogènes sont commercialisés (ALOA®, BMC *L. monocytogenes*®, CHROM Agar®, etc.) et ont été évalués par l'International Organization for Standardization (Genève).

Identification

La coloration de Gram permet l'observation des bacilles à Gram positif plus longs qu'à l'examen direct, parfois en courtes chaînettes ou en amas. L'examen entre lame et lamelle de cultures en bouillon conduites parallèlement à 22 et à 37 °C permet d'observer une mobilité à 22 °C et une quasi-absence à 37 °C.

Une orientation diagnostique (outre la mobilité à 22 °C) est obtenue par le caractère catalase positive et l'hydrolyse rapide de l'esculine (en 2 à 3 heures).

Le diagnostic de genre et d'espèce est obtenu en recourant à des galeries miniaturisées (API *Listeria*®, bioMérieux) ou à des systèmes automatisés (Vitek®), éventuellement complétés par des tests complémentaires, telle la recherche d'une activité phospholipasique. Les caractères différentiels au sein du genre sont regroupés dans le tableau 32.7. Seule l'espèce *L. monocytogenes* est pathogène pour l'homme ; quelques rares isolements de *L. ivanovii* ont été rapportés chez l'homme. L'identification du genre *Listeria* et de l'espèce est possible par MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight*).

Après avoir porté le diagnostic d'espèce, la souche sera caractérisée par détermination de marqueurs relevant, pour certains, du laboratoire de routine, pour d'autres de laboratoires spécialisés.

- sérovars : il existe 15 Ag somatiques O (I à XV) et 5 Ag flagellaires H (A à E) permettant de définir 16 sérovars (Paterson, Seeliger et Donker-Voet). Les caractérisations reposent en routine sur la mise en évidence par agglutination sur lame d'Ag O (sérum anti 1/2 et anti 4 Difco). Les sérovars 1/2a, 1/2b et surtout 4b regroupent près de 70 % des souches isolées en France chez l'homme. Le sérotypage peut également être réalisé par PCR multiplex à partir de la séquence du gène *prs* et de 4 séquences d'autres gènes permettant « le sérogroupe PCR ». Sur les 322 cas de listérioses

Tableau 32.7 **Caractères différentiels des espèces du genre *Listeria* et de *L. grayi* et *L. murrayi* (d'après J. Rocourt, H. Seeliger).**

	L. monocytogenes	*L. ivanovii*	*L. innocua*	*L. welshimeri*	*L. seeligeri*	*L. grayi**	*L. murrayi**
Hémolyse	+	++	–	–	+ (faible)	–	–
CAMP-test							
S. aureus	+	–	–	–	+	–	–
R. equi	–	+	–	–	–	–	–
Acidification							
D-xylose	–	+	–	+	+	–	–
L-rhamnose	+	–	v	v	–	–	v
Mannitol	–	–	–	–	–	+	+
α-méthylD-mannoside	+	–	+	+	–	+	
Nitrate réductase	–	–	–	–	–	–	+
Pathogènepour souris	+	+	–	–	–	–	–
Pouvoir pathogène naturel	Animaux Homme	Ovins	–	–	–	–	–
Sérovars	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e, 7	5	6a, 6b, 4ab, s.n.d.	6a, 6b	1/2b, 4c, 4d, 6b s.n.d.		

* *Murraya.*
CAMP : Christie, Atkins, Munch-Petersen ; s.n.d. : sérovar non désigné.

recensées en France par le CNR en 2009, les groupes se répartissaient ainsi : PCR IVb (sérovars 4b, 4d ou 4e) = 50 %, PCR IIa (sérovars 1/2a ou 3a) = 28 %, PCR IIb (sérovars 1/2b, 3b ou 7) = 14 % et PCR IIc (sérovars 1/2c ou 3c) = 8 %. Les formes maternofœtales appartiennent à 69 % au sérogroupe PCR IVb. Les sérovars « classiques » 1/2a, 1/2b et surtout 4b regroupent près de 70 % des souches isolées en France chez l'homme ;

- lysotype relevant de laboratoires spécialisés à l'aide de lots de phages permettant de typer plus de la moitié des souches ;
- méthodes moléculaires : dans le cas d'épidémies où la comparaison fine des souches bactériennes est nécessaire, c'est l'électrophorèse en champ pulsé qui est la méthode la plus discriminante.

Virulence

La difficulté consiste à distinguer les souches virulentes ou non virulentes. Le caractère hémolytique et/ou la recherche du gène de l'hémolysine-β sont en faveur d'une virulence. Mais la technique la plus couramment pratiquée pour identifier les souches virulentes repose sur le test d'Anton (Fig. 32.11). Il consiste en l'instillation au niveau du sac conjonctival d'un œil de lapin d'une suspension bactérienne (3 gouttes d'une culture de 18 heures en bouillon diluées dans 5 ml d'eau distillée) ; celle-ci est suivie, si la souche est virulente, de l'apparition d'une conjonctivite purulente (avec présence à l'écouvillonnage de grandes cellules recouvertes de bacilles caractéristiques ou en contenant). Cette recherche doit être pratiquée dans une animalerie protégée.

À noter que *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* sont pathogènes pour les souris inoculées par voie intrapéritonéale.

Diagnostic rapide

Des recherches antigéniques ont été conduites, visant à visualiser les bactéries à l'aide d'anticorps poly- ou monoclonaux fluorescents, ou à caractériser des antigènes notamment par technique immuno-enzymatique (ELISA) avec une sensibilité insuffisante.

Des techniques de PCR (qualitatives ou quantitatives) pratiquées directement sur produit pathologique, notamment LCR, et fondées sur la détection de gènes de virulence sont prometteuses. Certaines sont commercialisées et adaptées sur automates (Light Cycler, Taqman, etc.) ; d'autres sont des techniques maison détectant notamment le gène *hly*.

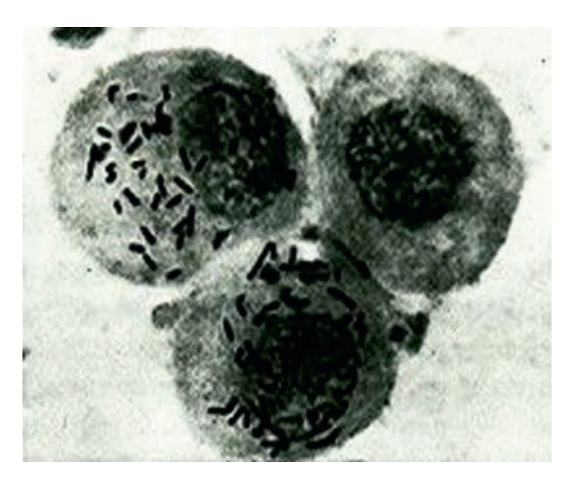


Fig. 32.11 **Test d'Anton.**

Diagnostic indirect

Les techniques sérologiques d'agglutination utilisant des suspensions antigéniques O et H sont décevantes par manque de sensibilité et de spécificité (communautés antigéniques avec *Staphylococcus* et *Enterococcus*) et sont sans intérêt en routine.

Plus encourageants sont les résultats obtenus par dosage d'anticorps antilistériolysine O (ALLO) par technique ELISA ou *immuno-blot* recherchant les anticorps dirigés contre un polypeptide aminoterminal de la listériolysine (fragment de la protéine, LLO-411). Mais ces deux derniers sérodiagnostics ne sont pas commercialisés.

Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques est déterminée par diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton.

L. monocytogenes est sensible à l'ampicilline, mais les céphalosporines, notamment de 3e génération, sont inactives. Les fluoroquinolones ont une activité réduite. En revanche, les aminosides sont actifs, surtout la gentamicine et la tobramycine. La fosfomycine est inactive sur *Listeria*. *L. monocytogenes* est naturellement résistante à l'acide nalidixique.

Le traitement de choix reste ampicilline + aminosides. Des résistances ont été signalées vis-à-vis de la rifampicine ou du triméthoprime–sulfaméthoxazole, de l'érythromycine, de la tétracycline.

L'antibiogramme comprendra la pénicilline, l'ampicilline, la gentamicine, la tétracycline, l'érythromycine, le chloramphénicol et l'association triméthoprime–sulfaméthoxazole.

Si l'épidémiologie des listérioses est bien suivie et contrôlée en France, nous ne sommes pas à l'abri de poussées épidémiques de grande ampleur. Les cas doivent être déclarés par le biologiste, les souches adressées au CNR, et les fiches d'enquête cas/témoin doivent être remplies pour chaque cas.

Prévention

La prévention repose surtout sur une éducation concernant le contrôle des aliments (chaîne du froid, phase de préparation, hygiène, etc.) et les consommateurs, notamment les femmes enceintes (hygiène alimentaire, nettoyage régulier des réfrigérateurs, etc.).

Pour en savoir plus

Avril JL, Dabernat H, Denis F, et al. Listeria. Bactériologie clinique. In : Paris : Ellipses ; 2000. p. 140–50.

Beumer RR, Hazeleger WC. Listeria monocytogenes : Diagnostic problems. Fems 2003 ; 35 : 191–227.

Bille JB, Catimel E, Bannerman E, et al. Api Listeria, A new and promising one-day system to identify Listeria isolates. Appl Environ Microbiol 1992 ; 58 : 1857–60.

Charpentier E, Courvalin P. Antibiotic resistance in Listeria spp. Antimicrob Agents Chemother 1999 ; 43 : 2103–8.

Cossart P. Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium Listeria monocytogenes. Proc Natl Acad Sci USA 2011 ; 108 : 19494–91.

Cottin J, Freland C, Carbonnelle B. Les bacilles à Gram positif (à l'exception des anaérobies). In : Bactériologie médicale : techniques usuelles. Paris : Simep ; 1987. p. 175–86.

Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, et al. Differentiation of the major Listeria monocytogenes serovars by multipex PCR. J Clin Microbiol 2004 ; 42 : 3819–22.

Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of Listeria spp. and Listeria monocytogenes : A review. Fems 2004 ; 29 : 851–5.

Gholizade HY, Poyard C, Juvin M, et al. Serodiagnosis of listeriosis based upon detection of antibodies against recombinant truncatured forms of listeriolysine. J Clin Microbiol 1996 ; 34 : 1391–2145.

Jacquet C, Rocourt J, Martin P. Listeria et listériose. In : Paris : ESKA ; 2007. p. 1206–18.

Kérouanton A, Marault M, Petit L, et al. Evaluation of a multiplex assay as an alternative method for Listeria monocytogenes serotyping. J Microbiol Meth 2010 ; 80 : 134–7.

Schlech WE. Epidemiology and clinical manifestations of Listeria monocytogenes infection. In : Gram-positive pathogenes. 2nd ed. Washington DC : ASM Press ; 2006. p. 601–8.

Adresse utile

Centre national de référence des *Listeria*
Institut Pasteur
5, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15
Centre collaborateur OMS pour les listérioses d'origine alimentaire

32.5 *Nocardia*

C. Martin

Généralités

Les *Nocardia* sont des bactéries appartenant à l'ordre des Actinomycétales aux côtés des espèces des genres *Streptomyces, Actinomyces* et *Mycobacterium*.

Les *Nocardia* sont des bacilles à Gram positif aérobies stricts qui peuvent former des branchements et des filaments constituant un mycélium vrai, septé, comme les champignons. Certaines espèces possèdent un certain degré d'acido-alcoolo-résistance.

Les données obtenues par les techniques de biologie moléculaire ont permis de démanteler le complexe *N. asteroides* et de mettre en évidence une diversité plus importante à l'intérieur de ce genre en individualisant plus de 90 espèces dont une trentaine est responsable d'infections.

Habitat et pouvoir pathogène

Les *Nocardia* sont des bactéries du sol que l'on trouve également au niveau des plantes et de l'eau. Elles colonisent également l'oropharynx, le tube digestif et la peau de l'homme et des animaux. Les nocardioses animales concernent principalement le bétail (mammites), les chiens, les chats.

La nocardiose est une infection granulomateuse et suppurative, localisée ou disséminée, qui résulte généralement de l'inhalation des germes et, plus rarement, de la contamination d'une plaie. Elle affecte principalement les patients immunodéprimés, mais l'observation de cas en l'absence apparente de facteur prédisposant n'est pas exceptionnelle. Les manifestations cliniques des nocardioses sont diverses (pulmonaires, cutanées, cérébrales et généralisées ; Tableau 32.8).

La nocardiose pulmonaire se présente après inhalation de poussières, de spores ou de mycélium sous forme d'une pneumonie chronique. Une dissémination de l'infection avec des métastases secondaires (péricardite, pleurésie, médiastinite, abcès cérébral et cutané) peut alors survenir, surtout chez des sujets immunodéprimés.

Les formes cérébrales peuvent être primitives et se présentent sous forme d'abcès unique ou multiples évoluant vers une méningo-encéphalite, le plus souvent sans atteinte méningée.

Les nocardioses présentent un polymorphisme clinique en relation avec le statut immunitaire du patient. Chez les sujets immunocompétents, les abcès, les lymphangites et

Tableau 32.8 **Agents étiologiques des différentes formes cliniques de nocardioses.**

Type d'infection	Espèce	Forme clinique
Cutanée primitive	*N. abscessus, N. brasiliensis, N. otitidiscaviarum* *N. beijinsensis*	Abcès, cellulite, mycétome
Pulmonaire	*N. abscessus, N. asteroides, N. brasiliensis* *N. cyriacigeorgica, N. farcinica, N. Nova* *N. otitidiscaviarum, N. transvalensis, N. paucivorans*	
Disséminée	*N. abscessus, N. asteroides, N. cyriacigeorgica,* *N. farcinica, N. transvalensis, N. pseudobrasiliensis,* *N. veterana*	Patients immunodéprimés, leucémie, transplantés (rénaux, cardiaques)
Oculaire	*N. arthritidis, N. asiatica, N. asteroides IV, N. brasiliensis,* *N. cyriacigeorgica, N. farcinica, N. neocaledoniensis,* *N. otitidiscaviarum, N. pseudobrasiliensis,* *N. transvalensis,*	
Système nerveux central	*N. farcinica, N. otitidiscaviarum*	
Péritonite	*N. asteroides*	

les mycétomes surviennent après un traumatisme (épines, piqûres d'insecte, morsures) au niveau des parties du corps découvertes et ne disséminent pas ou rarement pour donner une forme lymphocytaire sporotrichoïde.

Les mycétomes sont des infections chroniques localisées, siégeant le plus souvent aux membres inférieurs, observées en région tropicale ou subtropicale. Celles-ci sont causées soit par des *Actinomyces* anaérobies, soit par des champignons.

En France, les espèces responsables de nocardioses sont, dans la plupart des cas, *N. farcinica* (26 %), *N. nova* (20 %), *N. abscessus* (18 %) (anciennement associée à *N. asteroides* type I), *N. cyriacigeorgica* (12 %) (anciennement associée à *N. asteroides* type VI), et plus rarement, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. transvalensis*, *N. beijingensis*, *N. veterana*, *N. paucivorans*, *N. vinacea*, *N. acidivorans* auxquelles il faut ajouter les nouvelles espèces récemment découvertes : *N. wallacei*, *N. niwae*, *N. elegans*, etc.

On estime qu'en France environ 200 cas de nocardioses sont diagnostiqués chaque année, mais les nocardioses sont probablement sous-estimées. Il existe des épidémies nosocomiales, notamment dans les services qui hébergent des patients avec facteurs de risque (transplantés, etc.) ; l'origine est le plus souvent liée à des travaux de réfection, plus rarement à un patient source.

Diagnostic bactériologique

Les prélèvements reçus au laboratoire sont très divers et varient en fonction de la forme clinique observée : liquides de ponction (LCR, pleural), prélèvements de tissus (cutané, osseux, ganglionnaire, sphère ORL, péritonéal et cérébral) et pulmonaires (expectoration, aspiration bronchique, brossage bronchique, LBA). Les hémocultures sont rarement positives.

La recherche de *Nocardia* devra être spécifiée dès la prescription de l'examen pour que des moyens techniques et une prolongation des temps d'incubation soient mis en œuvre. De plus, la mise en culture des prélèvements pulmonaires doit être réalisée sans traitement de fluidification–décontamination utilisé pour les échantillons destinés à la recherche de mycobactéries parce que ce traitement affecte leur croissance.

Il n'existe pas de méthode sérologique pour le diagnostic de nocardiose.

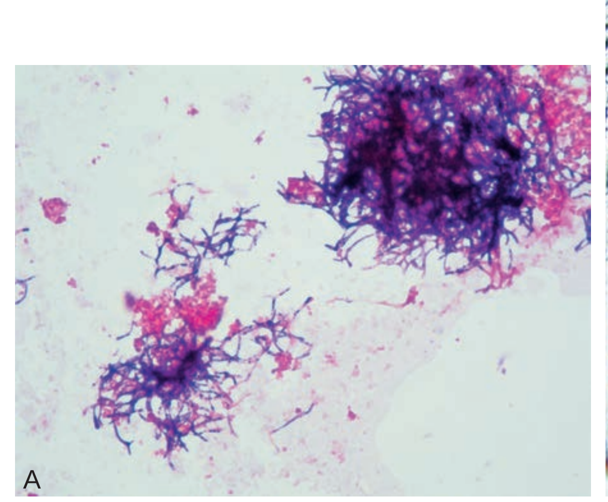
Examen macroscopique

Les liquides de ponction seront examinés macroscopiquement à la recherche de granulations et de grains évocateurs. Ces granulations sont observées dans les infections à *N. brasiliensis*, mais aussi avec les autres espèces de *Nocardia* et avec les *Actinomyces*.

Examen microscopique

Si des granulations sont observées, un examen entre lame et lamelle du pus dilué est pratiqué de telle sorte que les granulations soient écrasées pour rechercher la présence de ramifications et de filaments (Fig. 32.12A). Après coloration de Gram, l'aspect des *Nocardia* est variable (filaments, bacilles, coccobacilles), tant au niveau de la forme que de l'homogénéité de la coloration.

Une acido-alcoolo-résistance partielle avec la technique de Kinyoun modifiée (Encadré 32.5) est retrouvée de manière inconstante. Cette propriété que les *Nocardia* partagent avec *Rhodococcus* spp. les distingue des actinomycètes anaérobies (*Actinomyces*) et des *Streptomyces*.



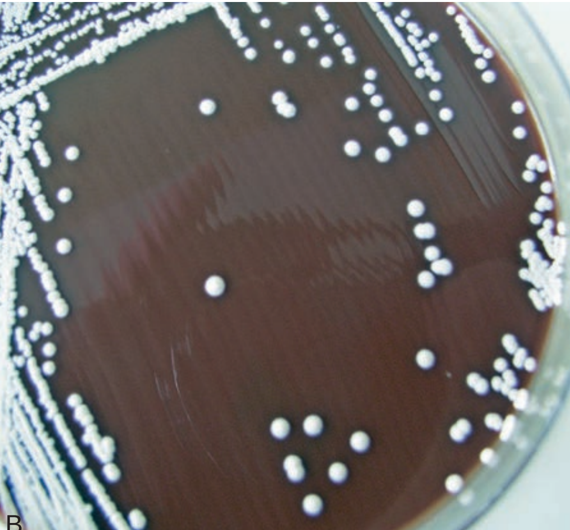


Fig. 32.12 Examen direct après coloration de Gram d'une aspiration bronchique (formes filamenteuses et branchées) (A). Culture de *Nocardia* sur gélose au sang cuit (B).

Encadré 32.5 **Méthode de détermination de l'acidorésistance des actinomycètes et des *Nocardia* : méthode de Kinyoun modifiée**

Réactifs

- Solution alcoolique saturée de fuchsine
  - Fuchsine basique : 4 g
  - Méthanol : 20 ml
- Solution aqueuse de phénol
  - Phénol : 48 g
  - Eau distillée : 600 ml
- Solution de travail : mélanger les 2 solutions (fuchsine et phénol)
- Solution de décoloration
  - Acide sulfurique : 20 ml
  - Éthanol à 95° : 980 ml
- Solution de contre-coloration
  - Bleu de méthylène hydrosoluble (ou chlorure) : 0,3 g
  - Eau distillée stérile q.s.p. : 100 ml

Technique

- Couvrir le frottis de fuchsine phéniquée 10 minutes sans chauffer
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir le frottis du mélange acide–alcool pendant 3 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir le frottis avec la solution de bleu de méthylène 2 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile et laisser sécher à l'air

Culture

La culture de ces bactéries est aisée si l'on utilise des milieux en tube évitant la dessiccation lors de l'incubation prolongés de ces cultures (3 semaines).

Les milieux utilisés sont des géloses Columbia au sang de mouton (5 %), des géloses au sang cuit, le milieu de Loewenstein-Jensen, le milieu Sabouraud et le milieu BCYE (*buffered-charcoal yeast extract*) sans supplément antibiotique utilisé pour la culture des légionelles.

Les colonies apparaissent généralement en 2 à 15 jours. Elles sont d'aspects variables, avec présence en périphérie d'hyphes. Elles sont légèrement surélevées, cérébriformes. La couleur varie du blanc au beige ou du jaune orangé au rouge. Cette pigmentation est masquée par la présence d'un mycélium de couleur blanche (Fig. 32.12B). À noter que les colonies ont tendance à s'incruster dans la gélose.

Identification

L'identification phénotypique des *Nocardia* est présomptive et devra être le plus souvent confirmée par une technique de biologie moléculaire.

La détermination de la résistance au lysozyme, à la mitomycine C, au 5-fluoro-uracile à l'aide de disques d'une culture sur milieu gélosé, la présence d'une catalase, d'une nitrate réductase et d'une β-galactosidase permettent une orientation vers le genre *Nocardia* (Tableau 32.9). L'identification à l'aide de galerie biochimique est abandonnée au profit des techniques moléculaires qui demeurent les méthodes de référence, mais qui sont réservées à des laboratoires spécialisés vu la rareté des isolats. L'observation des résistances à certains antibiotiques permet de conforter un diagnostic d'espèce. La spectrométrie de masse n'est pas encore assez performante pour permettre une identification fiable des espèces de ce genre. Les principaux caractères d'identification sont présentés dans le tableau 32.10.

Les techniques d'identification moléculaire font appel au séquençage du gène qui impose l'utilisation de l'analyse bio-informatique de séquences de l'ADN ribosomal 16S (Tableau 32.11). L'association du séquençage d'un ou de plusieurs autres gènes (*hsp65*, *rpoB*, *sod*, *secA*, *gyrB*, recA) permet d'augmenter la discrimination des espèces. En effet, une analyse multigénique au sein du genre *Nocardia* devient nécessaire afin d'éviter des identifications erronées chez des complexes d'espèces phylogénétiquement proches :

- le complexe *N. beijingensis* : *N. araoensis*, *N. arthritidis*, *N. beijingensis*, *N. niwae* ;
- le complexe *N. abscessus*/*N. asiatica* ;
- le complexe *N. nova* : *N. acidivorans*, *N. africana*, *N. elegans*, *N. kruczakiae*, *N. nova*, *N. veterana* ;
- le complexe *N. transvalensis*/*N. wallacei* dont le polymorphisme interespèce du gène *16S* est insuffisant pour les différencier.

Tableau 32.9 **Caractères d'orientation des actinomycètes aérobies.**

Caractères / Espèces	Mycélium aérien	Type respiratoire	Nitrate réductase	ONPG	Lysozyme	Mitomycine C	5-fluorouracile
Nocardia	+	Aérobie	+	+	R	R	R
Mycobacterium	–	Aérobie	V	V	S	ND	ND
Corynebacterium	–	Aérobie-anaérobie	+	V	S	ND	ND
Rhodococcus	V	Aérobie	V	–	S	S	S
Gordona	V	Aérobie	+	–	S	S	S
Tsukamurella	V	Aérobie	–	+	R	R	R

+ : positif ; – : négatif ; ND : non déterminé ; R : résistant ; S : sensible ; V : variable.

Tableau 32.10 **Caractères phénotypiques des principales espèces de *Nocardia*.**

Caractères / Espèces	Croissance à 45°	Hydrolyse						Activité enzymatique[a]				Antibiotique[b]							Profil de résistance aux antibiotiques[c]
		Caséine	Tyrosine	Hypoxanthine	Xantine	Esculine	Urée	PYR	γ–GLU	α–GLU	α–MAN	LNZ	AMC	CRO	IMI	AMK	CLA	CIP	
N. asteroides	–	–	–	–	–	–	+	–	–	+	–	S	R	S	S	S	R	R	VI
N. abcessus	–	+	–	–	–	–	+	–	+	+	–	S	S	S	V	S	R	R	I
N. farcinica	+	–	–	–	–	+	+	–	+	+	–	S	V	R	S	S	R	S	V
N. nova	–	–	–	–	–	–	V	–	+	–	–	S	R	S	S	S	S	R	III
N. brasiliensis	–	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+	S	S	R	R		R	R	ND
N. otitidiscaviarum	V	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	S	R	R	R	S		S	ND
N. transvalensis	–	–	–	+	–	+	+	+	+	+	+	S	ND	S	S	R	R	S	IV
N. pseudobrasiliensis		+	+	+	–	+	–	–	+	+	+	ND	R	R	S		S	S	ND
N. cyriacigeorgica	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	S	R	S	S		R	R	VI
N. paucivorans	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	ND	S	S	V		R	S	II

+ : positif ; – : négatif ; V : variable ; ND : non déterminé ; R : résistant ; S : sensible.

[a] PYR : pyrrolidonyl aminopeptidase ; γGLU : γ-glutamyl aminopeptidase ; αGLU : α-glucosidase et αMAN : α-mannosidase.

[b] AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; CRO : ceftriaxone ; IMI : imipénem ; AMK : amikacine ; CLA : claritromycine ; CIP : ciprofloxacine ; LNZ : linezolide.

[c] D'après Wallace RJ Jr.

Tableau 32.11 **Méthode de détection ou d'identification des gènes *ARN 16S* et *hsp*65 par amplification génique.**

Méthode de détection/ identification	Gène *hsp65* (441 pb)	Gène *ARN 16S* (606 pb)
Amorces	TB11 : 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3' TB 12 : 5'CTTGTCGAACCGCATACCCT-3'	Noc1 : 5'-GCTTAACACATGCAAGTCG-3' Noc2 : 5'-GAATTCCAGTCTCCCCTG-3'
Mélange réactionnel	2,5 U de *Taq* polymérase, 10 mM Tris-HCl [pH 9], 50 mM KCl, 1,5 µM $MgCl_2$, 200 µM, chaque désoxynucléoside triphosphate avec 10 µl d'extrait d'ADN (volume 25 µl)	
Amplification	94 °C 1 min ; 55 °C 1 min ; 72 °C 1 min Dénaturation initiale : 5 min 94 °C, extension finale : 10 min 72 °C	94 °C 1 min ; 58 °C 1 min ; 72 °C 1 min Dénaturation initiale : 5 min 94 °C, extension finale : 5 min 72 °C
Séquençage : utilisation des mêmes amorces		

Détection directe à partir de produits pathologiques

La détection génomique peut être réalisée directement à partir de produits pathologiques en utilisant des méthodes citées pour l'identification.

Sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques doit être effectuée sur toutes les souches isolées de tous les sites cliniques importants (poumon, abcès cérébral, localisation cutanée secondaire). Cependant, il n'existe pas de méthodes standardisées. La méthode de microdilution en milieu liquide utilisant la plaque Sensititre™ Myco Susceptibility Plate – Rapid Growing (mycobactérie à croissance rapide) peut être utilisée après validation avec des souches de référence ; seul le référentiel Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) existe pour ce genre bactérien. La méthode E-test® n'est pas une alternative à la méthode en microdilution en milieu liquide. Les antibiotiques à tester recommandés sont : l'amoxicilline–acide-clavulanique, la ceftriaxone, l'imipénème, l'amikacine, la tobramycine, la minocycline, la clarithromycine, la ciprofloxacine, la moxifloxacine, le triméthoprime–sulfaméthoxazole et le linézolide.

Le traitement des nocardioses reste problématique. Les associations imipénème + amikacine ou céfotaxime + amikacine en IV semblent pouvoir être recommandées en première intention, associées ou non au cotrimoxazole.

L'isolement de *Nocardia* à partir de prélèvements peu profonds qui peuvent être contaminés par la flore oropharyngée peut refléter une colonisation et non une infection ; de même, l'interprétation de l'isolement d'espèces rares et/ou peu pathogènes doit être examinée avec un œil critique si le prélèvement n'est pas « noble » et les isolements répétés.

Pour en savoir plus

Brow-elliott BA, Brown JM, Conville PS, et al. Clinical and laboratory features of the Nocardia spp. based on current molecular taxonomy. Clin Microbiol Rev 2006 ; 19 : 259–82.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes ; approved standard. In : CLSI document M24-A2. 2nd ed. Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute ; 2011.

Conville PS, Brown-Elliott BA, Wallace Jr. RJ, et al. 2012. Multisite reproducibility of the broth microdilution method for susceptibility testing of Nocardia species. J Clin Microbio 2012 ; 50 : 1270–80.

Devulder G, Perriere G, Baty F, et al. BIBI, a Bioinformatics Bacterial Identification Tool (http://pbil.univ-lyon1.fr/bibi/). J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 1785–7.

Farfour E, Leto J, Barritault M, et al. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. J Clin Microbiol 2012 ; 50 : 2702–7.

Hsueh PR, Lee TF, Du SH, et al. Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of Nocardia, Rhodococcus, Kocuria, Gordonia, Tsukamurella, and Listeria species. J Clin Microbiol 2014 ; 52 : 2371–9.

Laurent F, Freney J, Boiron P. Nocardia et actinomycètes aérobies apparentés. In : Freney J, Hansen W, Bollet C, Leclerc R, editors. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2003 [Section VI, chap. 1].

Lowman W, Aithma N. Antimicrobial susceptibility testing and profiling of Nocardia species and other aerobic actinomycetes from South Africa : comparative evaluation of broth microdilution versus the Etest. J Clin Microbiol 2010 ; 48 : 4534–40.

Mc Taggart LR, Doucet J, Witkowska M, et al. Antimicrobial susceptibility among clinical Nocardia species identified by Multilocus Sequence Analysis. Antimicrob Agents Chemother 2015 ; 59 : 269–75.

Minero MV, Marin M, Cercenado E, et al. Nocardiosis at the turn of the century. Medicine 2009 ; 88 : 250–61.

Rodriguez-Nava V, Zoropoguy A, Laurent F, et al. La nocardiose, une maladie en expansion. Antibiotiques 2008 ; 10 : 115–27.

Schlaberg R, Fisher MA, Hanson KE. Susceptibility profiles of Nocardia isolates based on current taxonomy. Antimicrob Agents Chemother 2014 ; 58 : 795–800.

Adresse utile

Observatoire français des nocardioses

Laboratoire de mycologie fondamentale et appliquée aux biotechnologies industrielles

Faculté de pharmacie, Université Claude Bernard Lyon I

8, avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08

32.6 *Tropheryma whipplei*

F. Fenollar

Généralités

Tropheryma whipplei est l'agent étiologique de la maladie de Whipple. Alors que la maladie a été décrite pour la première fois en 1907, la bactérie n'a été isolée qu'en l'an 2000 sur culture cellulaire. Cette bactérie avait auparavant été identifiée par séquençage d'un fragment du gène de l'ADNr 16S après extraction d'une biopsie duodénale d'un patient atteint de cette maladie. *T. whipplei* est un bacille à Gram positif à GC % élevé, de 0,2 µm de diamètre sur 1,5 à 2,5 µm de longueur.

Pouvoir pathogène et habitat

Les voies de transmission de *T. whipplei* sont vraisemblablement oro-orale et féco-orale. Le portage asymptomatique de *T. whipplei* est détecté principalement dans les selles, suggérant que cette bactérie peut être commensale. La prévalence de ce portage varie en fonction de l'âge, de la zone géographique étudiée et de l'exposition. En France, elle est estimée à 2 à 4 % dans la population générale adulte, moins de 1 % chez les jeunes enfants, 12 % chez les égoutiers et les personnes sans domicile fixe, et jusqu'à 40 % chez les familles de patients et de porteurs. *T. whipplei* a aussi été récemment associée à des infections aiguës (diarrhée, bactériémie et pneumopathie).

T. whipplei est responsable d'infections chroniques : (1) localisées sans atteinte histologique digestive associée, telles que l'endocardite ou l'encéphalite, et (2) systémiques, telles que la maladie de Whipple classique caractérisée par une atteinte histologique de l'intestin grêle.

T. whipplei est principalement connue pour être responsable d'une symptomatologie à type de diarrhée chronique et d'arthralgies, mais elle peut engendrer une symptomatologie très variée et aspécifique. Parmi ces manifestations cliniques, on notera des signes neurologiques (troubles de l'humeur, démences), cardiovasculaires (péricardites, endocardites) et ophtalmologiques (uvéites).

La maladie de Whipple classique survient majoritairement chez les sujets caucasiens de sexe masculin d'environ 50 ans. L'hypothèse actuelle est que la plupart de la population serait exposée à *T. whipplei* et que seules quelques personnes présentant un déficit immunologique spécifique, non caractérisé actuellement, développeraient une infection chronique.

Diagnostic biologique

Le diagnostic de la maladie de Whipple repose sur des examens non spécifiques (hémogramme, marqueurs de l'inflammation et étude histopathologique) et la mise en évidence d'une fraction du génome de la bactérie.

L'hémogramme peut montrer des anomalies mais elles sont inconstantes. Une élévation de la vitesse de sédimentation (VS) et de la protéine C réactive (CRP) peut être observée. Lors de la maladie de Whipple classique, une anémie microcytaire hypochrome ainsi qu'une hypoalbuminémie et une hypocholestérolémie (signes d'une malabsorption digestive) sont parfois retrouvées.

La présence de macrophages contenant du matériel PAS positif lors de la coloration au PAS (*periodic acid Schiff*) de biopsies duodénales est caractéristique de la maladie de Whipple classique (Fig. 32.13A). Cet examen doit être couplé à des analyses spécifiques telles que l'immunohistochimie réalisée avec des anticorps spécifiques anti-*T. whipplei* (Fig. 32.13B) et/ou une amplification génique par PCR ciblant des séquences répétées de *T. whipplei* pour en confirmer le diagnostic. La coloration au PAS peut aussi être réalisée à partir de valves cardiaques, de biopsies cérébrales ou d'autres prélèvements en fonction du tableau clinique. Là aussi, l'examen devra être couplé à des analyses spécifiques.

Diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique est un diagnostic direct génomique car la culture de la bactérie à partir de prélèvements est réservée aux laboratoires de référence.

Prélèvements

Le diagnostic bactériologique de routine est réalisé par amplification génique par PCR. Les prélèvements reçus au laboratoire sont très divers : biopsies duodénales, valves cardiaques, biopsies cérébrales, biopsies ganglionnaires, selles, salive, avec aussi des liquides de ponction (articulaire, LCR, humeur aqueuse) et dans le sang total. Les prélèvements sont stockés à –80 °C jusqu'à l'analyse.

Techniques

La technologie d'amplification génique en temps réel ciblant des séquences répétées de *T. whipplei* est le meilleur outil de détection actuel. Des exemples d'amorces et sondes sont présentés dans le tableau 32.12. L'amplification génique ciblant l'ADN ribosomique 16S couplé au séquençage permet aussi de détecter *T. whipplei*, mais sa sensibilité est médiocre par rapport à celle ciblant des séquences répétées.

Interprétation des résultats

Comme pour toute méthode de détection par amplification génique, on doit respecter strictement les protocoles afin d'éviter les contaminations de laboratoire. La détection du génome de la bactérie dans les selles et la salive suggère une maladie de Whipple classique, mais nécessite une confrontation des résultats avec notamment les données histologiques des biopsies duodénales avant d'attribuer un rôle étiologique dans la pathologie observée. L'absence de détection du génome de la bactérie dans les selles et la salive permet d'écarter avec une excellente valeur prédictive négative le diagnostic de maladie de Whipple classique. Enfin, il n'existe pas de diagnostic sérologique de routine.

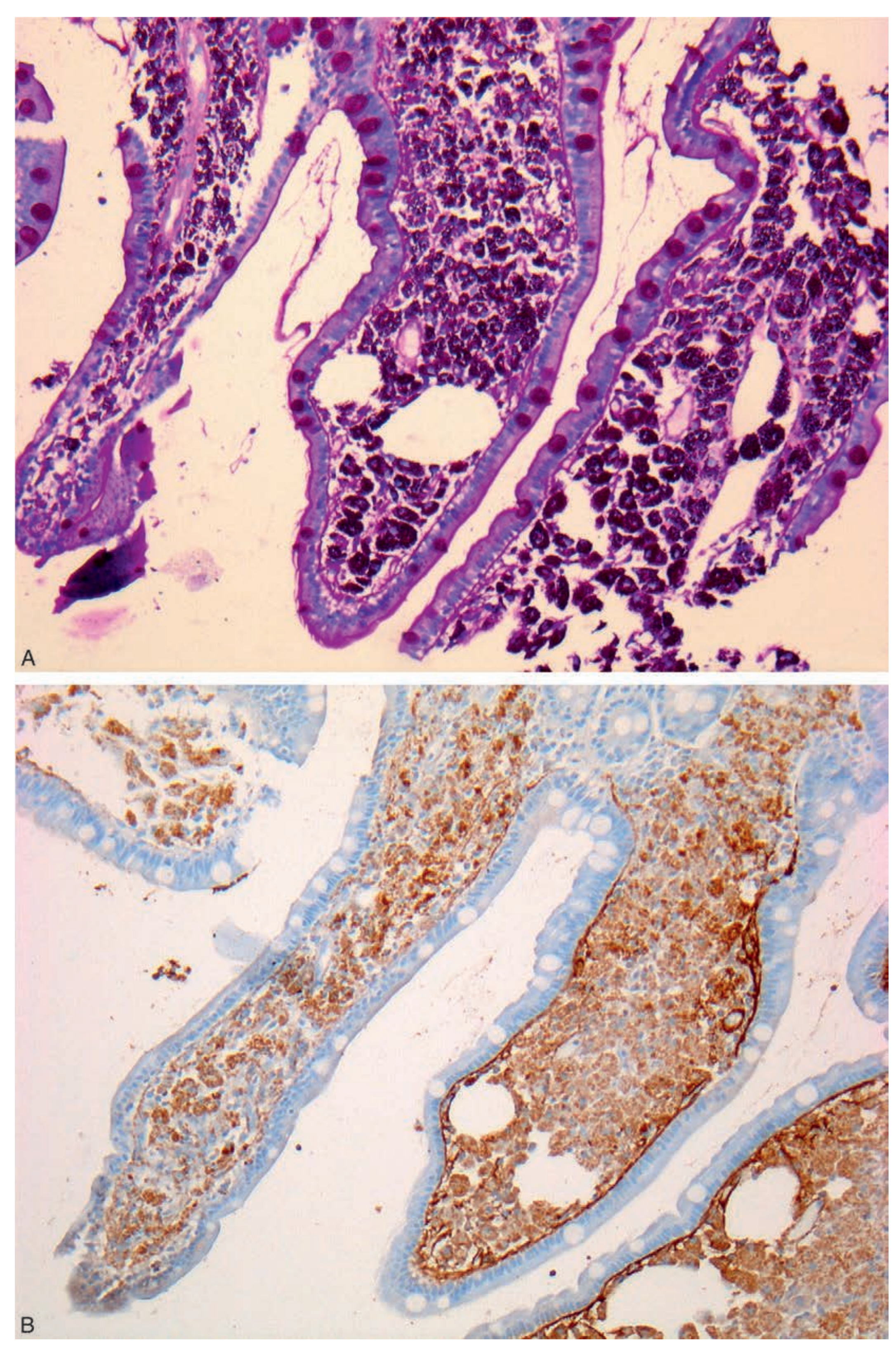


Fig. 32.13 Coloration au PAS (×100) (A), et immunohistochimie réalisée avec un anticorps polyclonal de lapin anti-*T. whipplei* ×100 (B), d'une biopsie duodénale de patient atteint de maladie de Whipple classique. La coloration au PAS montre des macrophages spumeux contenant du matériel coloré. L'immunohistochimie mets en évidence des zones immunomarquées, de couleur marron, par l'anticorps anti-*T. whipplei*. *(Clichés d'Hubert Lepidi, Marseille.)*

Tableau 32.12 **Couples d'amorces et sonde utilisés actuellement dans la détection du génome de *Tropheryma whipplei*.**

Séquences cibles	Noms des amorces : séquences (5′–3′)	Noms des sondes : séquences	Tailles de l'amplicon
Protéine de la famille WiSP (whi 2)	T_whi2_F : TGAGGATGTATCTGTGTATGGGACA	T_whi2_P : 6FAM- GAGAGATGGGGTGCAGGACAGGG	100 paires de bases
	T_whi2_R : TCCTGTTACAAGCAGTACAAAACAAA		
Protéine de la famille WiSP (whi 3)	T_whi3_F : TTGTGTATTTGGTATTAGATGAAACAG	T_whi3_P : 6FAM- GGGATAGAGCAGGAGGTGTCTGTCTGG	102 paires de bases
	T_whi3_R : CCCTACAATATGAAACAGCCTTTG		

Pour en savoir plus

Edouard S, Fenollar F, Raoult D. The rise of Tropheryma whipplei : a 12-year retrospective study of PCR diagnoses in our reference center. J Clin Microbiol 2012 ; 50 : 3917–20.

Fenollar F, Lagier JC, Raoult D. Tropheryma whipplei and Whipple's disease. J Infect 2014 ; 69 : 103–12.

Fenollar F, Célard M, Lagier JC, et al. Tropheryma whipplei endocarditis. Emerg Infect Dis 2013 ; 19 : 1721–30.

Lagier JC, Fenollar F, Lepidi H, et al. Treatment of classic Whipple's disease : from in vitro results to clinical outcome. J Antimicrob Chemother 2014 ; 69 : 219–27.

Keita AK, Raoult D, Fenollar F. Tropheryma whipplei as a commensal bacterium. Future Microbiol 2013 ; 8 : 57–71.

Lagier JC, Fenollar F, Raoult D. Whipple's disease and Tropheryma whipplei infections in internal medicine. When thinking about it ? How to treat ? Rev Med Interne 2014 ; 35 : 801–7.

Lagier JC, Lepidi H, Raoult D, et al. Systemic Tropheryma whipplei : clinical presentation of 142 patients with infections diagnosed or confirmed in a reference center. Medicine (Baltimore) 2010 ; 89 : 337–45.

Lagier JC, Fenollar F, Lepidi H, et al. Evidence of lifetime susceptibility to Tropheryma whipplei in patients with Whipple's disease. J Antimicrob Chemother 2011 ; 66 : 1188–9.

32.7 *Bacillus*

F. Denis, M.-C. Ploy

Le genre *Bacillus* comporte des bactéries à Gram positif en bâtonnets sporogènes et généralement mobiles. Ces bacilles sont aérobies ou aéro-anaérobies facultatifs.

Le genre *Bacillus* fait partie de la famille des *Bacillaceae* qui comprend aussi le genre *Clostridium*.

Classification

Le séquençage de l'ARNr 16S a conduit à la création de nouveaux genres auxquels ont été rattachées des bactéries préalablement classées parmi les *Bacillus* ; ainsi, les *Paenibacillus* regroupent des espèces antérieurement dénommées *B. polymyxa*, *B. macerans*, les *Brevibacillus* comprennent les ex-*B. brevis* et les *Geobacillus* les ex-*B. stearothermophilus*.

Le genre *Bacillus* est le mieux connu ; il comporte pas moins de 74 espèces différentes, très diverses aussi bien sur le plan génotypique que phénotypique. Les membres du « groupe B. *cereus* » sensu lato correspondent à une espèce unique, bien que réunissant différents pathovars : *B. cereus*, *B. anthracis* et *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycoides*. D'autres espèces peuvent intervenir en pathologie humaine.

Habitat et pouvoir pathogène

La plupart des espèces sont saprophytes et très répandues dans la nature ; la spore leur confère une très grande résistance dans le milieu extérieur. Ce sont des germes telluriques que l'on rencontre également dans l'eau et l'air, ainsi que dans des produits alimentaires (laits en poudre, produits farineux, épices).

B. anthracis, agent du charbon, est largement distribué dans le monde. C'est un pathogène obligatoire de l'homme et des animaux. Les animaux malades disséminent le germe ; le sol constitue le réservoir (champs, prés, etc.) ; les cadavres et les produits d'origine animale (peaux, laine, os, etc.) participent à la contamination des terrains et à la transmission directe à l'homme.

B. cereus est largement répandu dans la nature, le sol et l'air, et peut, de ce fait, notamment par ses spores, souiller les aliments.

Les autres *Bacillus* présents dans l'environnement (sol, air, etc.) peuvent être présents au niveau de la peau ou des muqueuses. Ils peuvent souiller les cultures, mais aussi être en situation pathogène pour des sujets débilités ou après introduction dans l'organisme lors d'interventions chirurgicales.

Bacillus anthracis

B. anthracis est responsable du charbon (anthrax pour les Anglo-Saxons), maladie de l'homme (rare en France) et des animaux, notamment des herbivores. L'homme se contamine directement ou indirectement à partir d'animaux infectés. La transmission d'homme à homme est extrêmement rare.

Chez l'homme, on distingue :

- une forme cutanée avec, au point d'inoculation (mains, bras, face), une « pustule maligne » qui, après un stade de papule érythémateuse, évolue vers une vésicule puis une escarre noirâtre. L'évolution est souvent favorable, mais cette lésion peut précéder un œdème malin et une septicémie. La forme cutanée est une maladie professionnelle. Cette forme représente 95 à 99 % des formes cliniques du charbon humain ;

- des formes viscérales plus rares qui peuvent être :
  - pulmonaires, consécutives à l'inhalation de spores ;
  - gastro-intestinales, après ingestion de viande ;
  - méningées.

  Le pronostic de ces formes est sombre.

La vaccination associée à l'amélioration des règles d'hygiène a permis une régression nette de la maladie.

B. anthracis est aussi un agent infectieux qui a été utilisé dans le bioterrorisme (infection de 22 personnes aux États-Unis en 2001).

Bacillus cereus sensu stricto

La majorité des cas se présentent sous forme de toxi-infections alimentaires. Après ingestion d'aliments contaminés, on observe des symptômes à type de vomissements survenant rapidement après l'ingestion (0,5 à 5 heures) s'il s'agit d'absorption de toxine préformée, ou plus tardifs (8 à 6 heures) avec douleurs abdominales, diarrhées profuses, nausées, quand la production d'entérotoxines thermolabiles se produit in vivo après prolifération des germes ingérés en grande quantité (10^7à 10^9 bactéries/g d'aliments).

Divers aliments peuvent être incriminés allant des viandes, au riz, aux purées de pomme de terre déshydratées, aux sauces tomates instantanées, etc.

La régression des symptômes est généralement rapide. Ces toxi-infections à *B. cereus* sont sûrement sous-estimées (5 % des étiologies aux États-Unis). On observe aussi des infections opportunistes à *B. cereus* survenant essentiellement chez des patients fragilisés (immunodépression, alcoolisme, etc.) et pouvant survenir avec différentes localisations (septicémies, abcès cérébraux, endocardites, pneumonies, ostéomyélites, salpingites voire myonécrose après blessures, etc.).

B. cereus a aussi été décrit dans des cas d'endophtalmies post-traumatiques ou dans des cas d'infections à la suite de blessures (brûlures, traumatismes) chez des sujets non immunodéprimés. Des infections chez le nouveau-né ont été décrites, notamment au niveau du cordon ombilical.

Autres espèces

Depuis plusieurs années, d'autres espèces de *Bacillus* – *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. brevis*, *B. thuringiensis* – ont été isolées dans des infections souvent nosocomiales avec parfois des pseudoépidémies hospitalières, tout particulièrement chez les immunodéprimés. Les *Bacillus* pouvant être des contaminants, il faut interpréter avec prudence leur isolement en fonction du contexte clinique et de la densité microbienne.

Diagnostic bactériologique

Il s'agit de diagnostic direct.

Les *Bacillus* sont des bacilles à Gram positif dont le Gram peut se négativer. Ce sont de grands bacilles (3 à 5 µm sur 1,25 µm/l) avec souvent des extrémités carrées pouvant se présenter dans les produits pathologiques en courtes chaînettes. En culture, on peut observer des formes longues parfois en « canne de bambou » pour *B. anthracis*. Les *Bacillus* sont le plus souvent mobiles par ciliature péritriche, sauf *B. anthracis*, toujours immobile.

La spore n'est généralement visible qu'après culture sur milieu sans peptone. Elle est ovale ou ronde ; elle peut être déformante ou non déformante, avec une localisation centrale, paracentrale, subterminale ou terminale (Fig. 32.14).

Les spores sont très résistantes (il faut 40 minutes à 120 °C pour les détruire) ; celles de *B. subtilis* sont parmi les plus résistantes. Ces spores sont utilisées comme témoin de stérilisation.

Prélèvements

Si les collectes et le traitement d'échantillons pratiqués en vue de l'isolement des différentes espèces courantes ne requièrent pas de précautions particulières, le prélèvement, le transport et la culture des prélèvements pour lesquels on suspecte une infection à *B. anthracis* nécessitent des précautions particulières pour la manipulation, avec recours à des blouses, gants, masques, lunettes et à un traitement de l'échantillon dans des unités à haute sécurité. Des précautions renforcées doivent être prises en cas d'analyse de poudres suspectes dans un contexte de bioterrorisme.

Nature des prélèvements

Pour *B. anthracis*, il s'agit surtout de prélèvements de lésions cutanées, de pustules voire d'hémocultures, de LCR ou de prélèvements respiratoires.

Pour tout patient arrivant aux urgences dans un contexte de bioterrorisme et suspecté de charbon, il faut réaliser un prélèvement, dès son arrivée, au niveau des narines à l'aide d'un écouvillon. Cet écouvillon sera plongé dans un bouillon ou dans du sérum physiologique stérile avant d'être ensemencé sur gélose ; un autre écouvillon pourra servir pour la biologie moléculaire (PCR).



Fig. 32.14 Spores centrales non déformantes de *Bacillus*.

Pour *B. cereus*, dans un contexte de toxi-infection alimentaire, on doit disposer de selles et tenter de trouver l'aliment suspect afin de numérer les germes dans celui-ci.

Dans les infections opportunistes à *B. cereus* et dues aux autres espèces de *Bacillus*, il s'agit le plus souvent de découvertes de hasard, à partir d'hémocultures, de prélèvements de pus ou de liquides biologiques de diverses natures.

Transport des échantillons

Il n'y a pas de précaution particulière, sauf en cas de suspicion de *B. anthracis* dont la manipulation se fait en classe 3 des agents biologiques vu la dangerosité.

Examen direct

L'examen direct permet de préciser la présence ou l'absence de gros bacilles, le plus souvent à Gram positif plus ou moins longs, à bouts carrés, parfois en chaînettes ou en cannes de bambou (Fig. 32.15). Les bacilles peuvent apparaître Gram négatif ou avec une coloration Gram positif plus intense aux extrémités.

Culture

La croissance à partir d'échantillons biologiques normalement stériles est facile, en 36 à 48 heures à 37 °C :

- en bouillon (hémocultures ou autres), automate d'hémoculture; le délai de positivité peut alors être très court (5 heures);
- sur gélose au sang, gélose « chocolat » enrichie (type Polyvitex®) ou gélose nutritive. Les colonies de *Bacillus* du groupe *cereus* sont habituellement de grande taille (1 à 7 mm), circulaires ou irrégulières, souvent mates et granuleuses (Fig. 32.16).

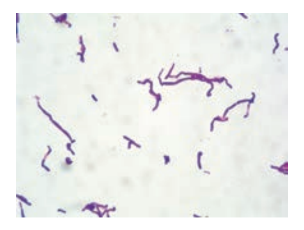


Fig. 32.15 Examen direct après coloration de Gram de *Bacillus cereus*.



Fig. 32.16 Aspect des colonies de *Bacillus cereus* sur gélose au sang.

Les colonies de *B. anthracis* sont blanches ou grises, non ou faiblement hémolytiques; elles sont plus petites et moins crémeuses que les colonies de *B. cereus*; elles creusent généralement la gélose et sont difficiles à prélever.

Les colonies de *B. licheniformis* ont un aspect de lichen. Mais la morphologie des colonies peut varier pour une espèce donnée et seule la galerie et les tests complémentaires permettent souvent de trancher.

À partir des prélèvements polymicrobiens en cas d'infection à *B. anthracis* et de suspicion d'intoxications alimentaires :

- on peut procéder à un chauffage à 62,5 °C durant 15 minutes qui détruit tous les contaminants non sporulés et produit un choc thermique qui activera la germination. On pourra alors ensemencer les milieux riches non sélectifs (bouillon, gélose au sang, gélose nutritive);
- on peut avoir recours à des milieux sélectifs souvent ensemencés directement avec des échantillons fraîchement récoltés;
- pour *B. anthracis*, on recourt à la gélose de Knisely contenant polymyxine, lysozyme, EDTA, acétate de thallium (PLET);
- pour *B. cereus*, dans une perspective d'isolement, d'identification et de numération (produits alimentaires, selles), on peut utiliser des milieux contenant jaune d'œuf, mannitol et un indicateur permettant de révéler l'hydrolyse de la lécithine ainsi que l'acidification du mannitol et souvent un inhibiteur des Gram négatif (polymyxine); les plus utilisés sont les milieux MEYP, PEMBA et BCM. Il est préférable de ne pas utiliser des milieux sélectifs comme la gélose au sang + acide nalidixique, certaines souches pouvant être inhibées.

Identification

Caractères morphologiques

À partir des bouillons ou des colonies des milieux solides, on pratiquera des colorations :

- la coloration de Gram permet de préciser la morphologie des bacilles, la présence ou l'absence de spores, leur aspect rond ou ovalaire, déformant ou non déformant et leur topographie dans le corps bactérien;
- une coloration de spore peut être pratiquée si l'aspect réfringent à l'état frais n'est pas suffisant. Cependant, la recherche de spores peut être facilitée par un examen au microscope à contraste de phase. La coloration au vert malachite est assez simple à réaliser. Une lame fixée comme pour une coloration de Gram est recouverte d'une solution aqueuse à 10 % de vert malachite; on laisse agir pendant 40 à 45 minutes, puis après rinçage à l'eau du robinet, on contre-colore avec une préparation de safranine à 30 % durant 30 secondes. Après séchage, on observe les spores en vert et les débris cellulaires en rose-rouge;
- la mobilité sera systématiquement recherchée, les espèces *B. anthracis* et *B. mycoides* étant immobiles. La recherche de capsule sur les souches virulentes de *B. anthracis* peut être recherchée :
  - soit en révélant le caractère mucoïde des colonies apparues après ensemencement sur gélose nutritive contenant 0,5 % de bicarbonate de sodium, avec incubation 18 heures en atmosphère de CO_2 (5 à 7 %);

– soit en ensemençant une petite quantité d'une colonie suspecte dans 2,5 ml de sérum de veau fœtal et en recherchant la capsule par la technique à l'encre de Chine après 6 à 18 heures d'incubation à 37 °C.

Caractères culturaux

Les *Bacillus* sont aérobies, mais certaines espèces sont aérobies strictes ou anaérobies facultatives ; de ce fait, la recherche d'une croissance en anaérobiose peut être intéressante. Les *Bacillus* sont catalase positive, oxydase variable.

Le comportement des souches sur gélose au sang de mouton à la recherche d'une hémolyse ou sur milieu à l'œuf pour révéler une activité lécithinasique peut être utile pour l'identification.

L'étude de l'acidification des sucres est souvent délicate et longtemps on a eu recours au milieu de Smith-Gordon-Clark.

Compte tenu des difficultés rencontrées pour réaliser un diagnostic d'espèce, on préfère, plutôt que de rechercher les caractères phénotypiques avec des techniques « maison », recourir à des tests miniaturisés tels les systèmes API 20E® et API 50 CHB® ou à la carte *Bacillus* du système d'identification automatisé Vitek® (bioMérieux).

L'ensemencement des galeries API 20E® doit être réalisé avec un inoculum plus dense que pour les entérobactéries. La confirmation peut être obtenue par l'ensemencement d'une galerie API 50 CHB®.

Les autres caractères énumérés précédemment (morphologie, caractères culturaux, etc.) doivent être pris en compte dans l'identification. Les principaux caractères différentiels entre les différentes espèces susceptibles d'être isolées en pathologie humaine sont regroupés dans le tableau 32.13.

Pour l'identification des souches de *B. anthracis*, des tests d'immunochromatographie ont été développés, mais ils ne sont pas commercialisés. Des techniques d'amplification génique (PCR et PCR en temps réel) ont été utilisées soit dans le cadre d'analyse de poudres dans un contexte bioterroriste, soit pour confirmer le caractère virulent des souches dans une perspective de diagnostic.

Toute souche suspecte d'être un *B. anthracis* doit être adressée à un laboratoire LSB 3 du réseau « Biotox-Piratox » ou au Centre national de référence (CNR) *Bacillus*.

Par PCR, on peut rechercher les facteurs de virulence portés par deux plasmides, pOX1 et pOX2, et celui porté par une séquence spécifique chromosomique de 277 bp (Ba823).

Tableau 32.13 **Caractères différentiels des espèces de *Bacillus* les plus souvent rencontrées en pathologie humaine.**

Caractères	Groupe *B. cereus*				Groupe *B. subtilis*			*B. circulans*	*B. coagulans*
	B. cereus	*B. anthracis*	*B. thuringiensis*	*B. mycoides*	*B. subtilis*	*B. licheniformis*	*B. pumilus*		
Chaînettes	+	+	+	+	–	V	–	–	V
Mobilité	+	–	+	–	+	+	+	+	+
Culture anaérobiose	+	+	+	+	–	+	–	+	+
Culture 50 °C	–	–	–	–	V	+	V	–	+
Lécithinase*	+	+	+	+	–	–	–	–	–
Gélatinase	+	+	+	+	+	+	+	–	–
Hémolyse sang mouton	+	–	+	–					
Acidification									
– Glycérol	+/V	–	+	+	+	+	+	V	+
– Mannitol	–	–	–	+	+	+	+	+	V
– Saliciline	+	–	+	+	+	+	+	+	+
Croissance 10 µg de pénicilline	+	–							
Réduction des nitrates	V	+	+	+	+	+	–	V	V
Arginine dihydrolase	V	–	+	–	–	+	–	V	V
Production d'indole	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Gélatinase	+	V	+	+	+	+	+	–	-

* Réaction au jaune d'œuf.
V : variable.

La recherche de toxine du charbon, avec ses trois composants protéiques, peut être réalisée par réaction immuno-enzymatique.

L'étude du pouvoir pathogène des souches de *B. anthracis* est rarement pratiquée actuellement, mais si la recherche est effectuée, elle doit l'être dans une animalerie protégée. On a recours à un cobaye par inoculation de 0,5 ml d'une culture de 24 heures par voie sous-cutanée. La mort survient en 36 à 48 heures. À l'autopsie, on observe un œdème gélatineux, mou au point d'injection. Les viscères sont congestionnés et noirs, et le sang contient de nombreux bacilles de morphologie évocatrice, de même que les empreintes de foie, de rate et de liquide d'œdème. Cette recherche du pouvoir pathogène doit impérativement être réservée à des laboratoires possédant une animalerie bien contrôlée. Le complexe entérotoxinogène produit par certaines souches de *B. cereus* peut être recherché directement sur aliments ou selles, sur culture cellulaire ou à l'aide de trousses commercialisées tel le test Oxoid BCET-RPLA® (Oxoid Ltd).

Interprétation des résultats

En dehors de l'isolement de *B. anthracis*, qui, s'il est confirmé, affirme son rôle en pathologie, la découverte des autres espèces de *Bacillus* doit être interprétée avec prudence, sauf s'il s'agit d'isolements répétés ou si les souches sont en culture pure et dans un certain contexte, tels les immunodéprimés ou des endophtalmies.

Dans les intoxications alimentaires, on suspecte *B. cereus* quand le nombre de germes est > 10^5/g dans l'aliment incriminé, si la même souche est présente dans les selles et/ou les vomissements du patient, et si elle produit une toxine émétique et/ou une entérotoxine.

L'étude de la sensibilité des *Bacillus* aux antibiotiques peut être utile au diagnostic. *B. anthracis* est « classiquement » sensible à la pénicilline G, contrairement à *B. cereus* (CMI_{50} 0,125 versus 8 mg/l).

Mais elle peut aussi être utile pour les choix thérapeutiques.

Pour l'antibiogramme, bien que la détermination des CMI en milieu liquide soit la référence, on peut recourir en routine à la méthode de dilution en gélose ou aux E-tests®. Pour la recherche de β-lactamase, il est recommandé pour *B. anthracis* d'adapter le test à la nitrocéfine (Céfinase®, bioMérieux) en milieu liquide avec lecture après incubation de 30 minutes à 37 °C.

Pour *B. anthracis*, des résistances acquises à la pénicilline par production de β-lactamase (Bla 1 ou Bla 2) ont été signalées. Cette espèce est, en revanche, sensible à la gentamicine, aux glycopeptides et souvent à la ciprofloxacine.

La prophylaxie recommandée après exposition repose sur l'administration de ciprofloxacine pendant 60 jours.

B. cereus résiste à l'ampicilline et aux céphalosporines, mais est habituellement sensible aux aminosides, à la ciprofloxacine, à la clindamycine et à la vancomycine. Pour ce dernier antibiotique, certaines souches de *Bacillus* et de *Paenibacillus* ont été décrites comme étant résistantes ou avec une activité peu bactéricide.

Devant cette diversité de comportement, un antibiogramme est conseillé pour toutes les souches susceptibles d'être pathogènes.

Pour en savoir plus

Avril JL, Dabernat H, Denis F, et al. Bacillus. In : Bactériologie clinique. Paris : Ellipses ; 2000. p. 155–69.

Cottin J, Freland C, Carbonnelle B. Les bacilles à Gram positif (à l'exception des anaérobies). In : Carbonnelle B, Denis F, Marmonier A, et al., editors. Bactériologie médicale : techniques usuelles. Paris : Simep ; 1987. p. 175–86.

Guinebretiere MH, Sonchis V. Bacillus cereus sensu lato. Bull Soc Fr Microbiol 2003 ; 18 : 95–103.

Hernandez-Guinat. Bacillus. In : L'antibiogramme. 3e éd. Paris : ESKA ; 2012. p. 439–48.

Logan NA, Turnbull PCB. Bactéries aérobies sporulées. Paris : ESKA ; 2004.

Philippon A. Bacillus anthracis, agent possible du bioterrorisme. Assoc Anciens Élèves Institut Pasteur 2002 ; 170 : 4–9.

Tessou R, Hance P, Buisson Y. Les infections humaines à Bacillus. Bull Soc Fr Microbiol 1998 ; 13 : 137–51.

Adresse utile

Centre national de référence des *Bacillus*
Institut Pasteur
28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 1

Chapitre 33

Bactéries spiralées

B. Jaulhac, S. de Martino, C. Le Brun

PLAN DU CHAPITRE

33.1 Généralités sur les spirochètes

B. Jaulhac, S. de Martino, C. Le Brun

Les spirochètes sont des bacilles mobiles, de forme hélicoïdale, mesurant de 5 à 35 μm de long sur 0,1 à 0,3 μm de large. Cette petite taille leur permet de passer aisément des filtres de 0,45 μm de porosité, voire plus facilement pour certains spirochètes de 0,22 μm (technique de purification et d'enrichissement sélectif de culture bactérienne). Leur structure comprend une membrane externe en trois feuillets recouvrant une mince couche de peptidoglycane, qui est intimement liée à la membrane cytoplasmique sous-jacente. Entre la membrane externe et le peptidoglycane se trouvent des endoflagelles insérés aux deux extrémités de la bactérie et enroulés autour du corps bactérien qui constituent l'organe moteur et donnent sa forme à la bactérie.

Les spirochètes ne sont pas visualisés en microscopie classique car leur diamètre est inférieur au pouvoir de résolution d'un microscope optique, mais sont observables par microscopie à fond noir, au grossissement × 1000 ou plus. Ils apparaissent alors comme des spirales ondulées et mobiles. La disposition particulière de leurs flagelles leur donne une mobilité tout à fait spécifique combinant mouvements de torsion, de rotation et de compression.

La méthode de Gram n'est pas utilisable pour visualiser les spirochètes car ils ne prennent pas cette coloration ; ils sont aussi colorables faiblement par le Giemsa. Ils sont classiquement visualisés par des colorations argentiques (Fontana-Tribondeau, Warthin-Starry ; Encadré 33.1). Celles-ci sont de réalisation délicate et peuvent déformer la morphologie des spirochètes. À l'inverse, certaines structures tissulaires peuvent être confondues avec des spirochètes, comme la fibrine, entraînant des faux positifs à la lecture de lames tissulaires. Les spirochètes peuvent aussi être visualisés par l'acridine orange ou le DAPI (4′, 6-Diamino-2-phenyllindole) (Fig. 33.1 et 33.2).

Les principaux genres de spirochètes d'intérêt médical comprennent :

- le genre *Borrelia*, responsable des fièvres récurrentes et de la borréliose de Lyme, qui touchent l'homme et l'animal ;
- le genre *Leptospira*, responsable des leptospiroses, qui touchent l'homme et l'animal ;
- le genre *Treponema*, responsable de la syphilis et des tréponématoses non vénériennes, touchant exclusivement l'homme.

Les autres genres de *Spirochaetaceae* (*Brevinema*, *Critispira*, *Spirochaeta*, *Spironema*), non pathogènes pour l'homme, ne seront pas évoqués ici.

Encadré 33.1 Coloration de Warthin-Starry

Solution tampon à pH 3,6

- Eau distillée 1 litre avec acide citrique 1 %.
- Ajuster le pH de la solution avec environ 1 à 5 ml de la solution d'acide citrique.

Nitrate d'argent 1 % (imprégnation)
- Maintenir durant 45 minutes 100 ml de la solution tampon pH 3,6 à 56 °C au bain-marie.
- Ajouter 1 g de nitrate d'argent, homogénéiser puis faire immédiatement l'imprégnation.

Solution n° 2 (réduction) : toujours travailler avec la solution tampon à 56 °C (45 minutes) ; mettre :
- 2,5 g de gélatine dans 50 ml de tampon pH 3,6
- 1 g de nitrate d'argent dans 50 ml de tampon pH 3,6
- 0,12 g de pyrocatéchol dans 50 ml de tampon pH 3,6 à préparer juste avant de faire le mélange

Mélanger :
- 3 ml de nitrate d'argent 2 % dans le tampon pH 3,6
- 7,5 ml de gélatine à 5 % dans le tampon pH 3,6
- 4 ml de pyrocatéchol à 0,25 % dans le tampon pH 3,6

Toutes les manipulations doivent se dérouler entre 56 et 60 °C.

Imprégnation
- Amener la solution tampon pH 3,6 à 56 °C (bain-marie durant 45 minutes).
- Ajouter 1 % de nitrate d'argent (1 g pour 100 ml) et plonger les lames dans la solution après homogénéisation, puis mettre immédiatement à l'abri de la lumière dans une étuve à 56 à 60 °C durant 1 heure à 1 heure 10.

Réduction
- Les lames sont placées sur un portoir au-dessus d'un bain-marie à 56 °C en évitant les courants d'air.
- Recouvrir les lames avec la solution 2 qui a été préparée au dernier moment à 56 °C (le pyrocatéchol doit être ajouté à la solution 2 juste avant la révélation).
- Le matériel sur lame prend progressivement (quelques secondes à une minute) une teinte brun doré. Lorsque cette couleur est atteinte, arrêter la réaction en plongeant les lames dans de l'eau distillée à 56 °C durant 30 secondes en agitant.
- Laver ensuite durant 5 minutes dans 1 à 2 bains d'eau distillée.

Fixation
- Les lames sont ensuite passées dans l'alcool puis le toluène et montées.

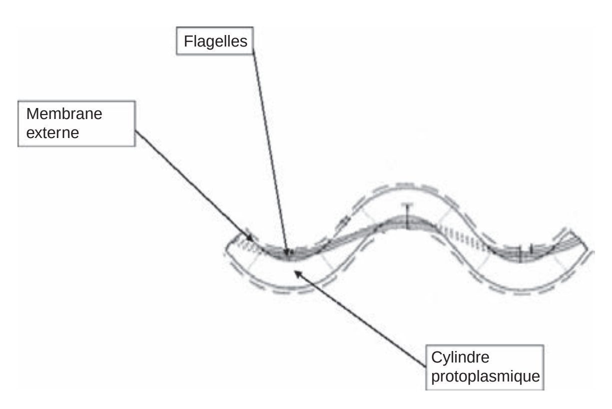


Fig. 33.1 Structure schématique de *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

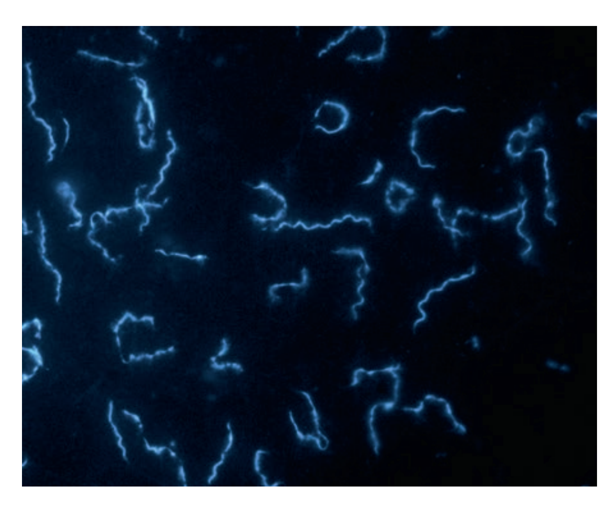


Fig. 33.2 *Borrelia burgdorferi* sensu lato, ×400, coloration au DAPI (4′,6-Diamino-2-phénylindole).

33.2 Genre *Borrelia*

B. Jaulhac, S. de Martino, C. Le Brun

Généralités

Les agents des borrélioses humaines sont transmis par des arthropodes vecteurs hématophages. Ce sont des bactéries spiralées qui appartiennent à l'ordre des *Spirochaetales*, à la famille des *Spirochaetaceae* et au genre *Borrelia*. Ce dernier comprend plus d'une trentaine espèces dont certaines sont responsables d'infections humaines. Au sein de ces dernières, on distingue sur un plan clinique deux catégories : celles responsables de la borréliose de Lyme et celles responsables des fièvres récurrentes (Tableau 33.1).

La borréliose de Lyme est répandue dans tout l'hémisphère nord. En Europe, elle est principalement causée par trois espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii et B. afzelii*), tandis qu'aux États-Unis seule l'espèce *B. burgdorferi* sensu stricto est reconnue comme pathogène pour l'homme. Elle est transmise à l'homme par des tiques dures du genre *Ixodes*.

Les fièvres récurrentes sont, elles, transmises soit par *Pediculus humanus*, poux de corps, vecteur de *Borrelia recurrentis*, agent de la fièvre récurrente épidémique cosmopolite, soit par les tiques molles du genre *Ornithodoros* et *Argas*, vecteurs de diverses espèces *Borrelia*, agents des fièvres récurrentes endémiques, sévissant dans différentes régions du monde (péninsule Ibérique, Moyen-Orient, Causase, Afrique, Amérique, Asie). Plus récemment, une autre espèce, *Borrelia miyamotoi*, apparentée aux agents de fièvres récurrentes, a été identifiée dans les tiques dures du genre *Ixodes* en Asie, en Europe et aux États-Unis. Cette espèce est responsable de fièvre chez l'humain.

Épidémiologie

Les espèces pathogènes de *Borrelia* nécessitent pour leur transmission la présence dans l'environnement humain du réservoir habituel de ces *Borrelia* et de l'arthropode vecteur

Tableau 33.1 ***Borrelia* pathogènes pour l'homme, leur vecteur et leur répartition géographique.**

Agents de la borréliose de Lyme	Vecteur	Répartition géographique
Borrelia burgdorferi sensu stricto	*Ixodes daminii* *Ixodes ricinus*	États-Unis, Europe
Borrelia garinii *Borrelia afzelii*	*Ixodes ricinus* *Ixodes persulcatus*	Europe, Asie
Borrelia valaisiana *Borrelia bissettii* *Borrelia spielmanii* *Borrelia bavariensis*	*Ixodes ricinus*	Europe de l'Ouest
Agents des fièvres récurrentes	**Vecteur**	**Répartition géographique**
Borrelia recurrentis	*Pediculus humanus*	Cosmopolite
Borrelia duttonii	*Ornithodoros moubata*	Afrique orientale et centrale, Madagascar, Comores
Borrelia hispanica	*O. erraticus erraticus*	Péninsule Ibérique, Maghreb, Grèce, Chypre, Syrie
Borrelia crocidurae	*O. erraticus sonrai*	Nord de l'Afrique (du Maroc à l'Égypte) Sud de l'Afrique (du Sénégal au Kenya) Proche-Orient
Borrelia tillae	*O. zumpti*	Afrique du Sud
Borrelia persica	*O. tholozani*	Sud Russie, Iran, Irak, Syrie, Liban, Israël, Palestine, Chypre
Borrelia latyschewii	*O. tartakowskyi*	Asie centrale, Iran, Russie
Borrelia caucasica	*O. verrucosus*	Caucase, Arménie, Azerbaïdjan, Géorgie
Borrelia hermsii	*O. hermsi*	Ouest des États-Unis, Canada
Borrelia turicatae	*O. turicata*	Canada, États-Unis, Mexique
Borrelia parkeri	*O. parkeri*	Ouest des États-Unis
Borrelia venezuelensis	*O. venezuelensis*	Amérique centrale

compétent. L'homme est un hôte accidentel de *Borrelia*, sauf pour la fièvre récurrente épidémique à *B. recurrentis,* transmise par les poux et pour la fièvre récurrente endémique à *B. duttonii,* transmise par les *Ornithodoros*, pour lesquelles l'homme semble être le seul réservoir.

Borréliose de Lyme

La borréliose de Lyme est l'anthropozoonose bactérienne transmise par piqûre de tique dure du genre *Ixodes,* la plus fréquente dans l'hémisphère nord. Son nom provient de la petite ville de Lyme (Connecticut, États-Unis) où la maladie été authentifiée pour la première fois en 1977, bien que plusieurs de ces manifestations cliniques aient déjà été observées en Europe au début du XXe siècle. La répartition géographique de cette infection est superposable à celle de son vecteur, qui sévit dans les zones tempérées, régions humides et boisées en dessous de 1200 mètres d'altitude.

Dans le vecteur, *B. burdorferi* sensu lato survit et se multiplie dans l'intestin des tiques *Ixodes.* Ce sont des arthropodes exophiles forestiers. On en distingue plusieurs espèces dont seules certaines piquent l'homme : *Ixodes ricinus* en Europe occidentale, *Ixodes persulcatus* en Asie, *Ixodes scapularis* sur la côte Est des États-Unis et *Ixodes pacificus* sur la côte Ouest des États-Unis. Entre le début du printemps et la fin de l'automne, ces tiques effectuent un repas sanguin nécessaire à leur développement. Lors de ce repas sanguin, à tous les stades de leur développement (larve, nymphe ou adulte), les tiques peuvent ingérer ou transmettre *B. burgdorferi* sensu lato. Elles parasitent ainsi les animaux sauvages vivant en zones boisées, humides et tempérés de l'hémisphère nord. En Europe, ce sont les petits rongeurs qui constituent le réservoir majoritaire de *B. burgdorferi* sensu lato et les mammifères de taille moyenne, les oiseaux ainsi que les grands mammifères comme les cervidés jouent également un rôle essentiel dans la bio-écologie du vecteur. L'homme, qui s'insère dans ce cycle, est en fait un hôte accidentel terminal des tiques. Le taux d'infestation des vecteurs et donc le risque de transmission du pathogène augmentent au fur et à mesure du stade de développement des tiques. Cependant, ce sont les nymphes qui offrent le plus de risque de transmission de *B. burgdorferi* sensu lato à l'homme car leur taux d'infestation, pouvant atteindre en France 8 à 20 % selon la région, est presque aussi élevé que celui des tiques adultes et, ne mesurant que quelques millimètres, elles échappent volontiers à la vigilance des sujets exposés. Enfin, leur densité peut être 2 à 6 fois supérieure à celle des tiques adultes selon les zones.

L'incidence de la borréliose de Lyme est variable d'une région à l'autre. En Europe, elle augmente selon un gradient Sud-Nord et Ouest-Est. Elle atteint une incidence maximale dans l'Est de l'Europe avec, en Slovénie et en Autriche, plus de 130 cas pour 100 000 habitants. En France, l'incidence moyenne est estimée à près de 42 cas/100 000 habitants. En fonction des régions, l'incidence moyenne varie de 184 pour 100 000 habitants en Limousin et 157 pour 100 000 habitants en Alsace à 0 en Nord-Pas-de-Calais et en Bourgogne. Elle est presque absente du pourtour méditerranéen car le climat trop sec ne permet pas le développement du vecteur. Entre 2009 et 2012, cette incidence s'est révélée stable au niveau national (de 41 à 44 cas pour 100 000 habitants). La multiplication des contacts entre la population et la nature favorise l'apparition des cas dans les zones à risque. La maladie est plus fréquente chez les jeunes enfants et chez les adultes après 50 ans. Durant l'année, le pic de fréquence de la borréliose de Lyme correspond à la période d'activité maximale des tiques, soit du début du printemps à la fin de l'automne.

Dans le complexe *B. burgdorferi* sensu lato, 20 espèces sont décrites à ce jour. Trois espèces, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* et *B. afzelii*, sont les plus fréquemment décrites comme pathogènes pour l'homme en Europe occidentale.

Après une piqûre de tique infectée par *Borrelia burgdorferi* sensu lato, il a été estimé que seuls 5 % des sujets contaminés développent une infection active et 95 % font une séroconversion sans signe clinique.

Quelle que soit l'espèce en cause, sa dissémination cutanée initiale peut se traduire dans près de 90 % des cas par l'apparition d'un érythème migrant autour du point de piqûre. Il s'agit d'une réaction inflammatoire centrifuge centrée par le point de piqûre, générée par la réaction inflammatoire cutanée en regard de la multiplication et la migration dans la peau des spirochètes. Les manifestations secondaires, après dissémination systémique des spirochètes, sont moins spécifiques et variables. Les observations épidémiologiques ont associé préférentiellement certaines manifestations à certaines espèces. Ainsi, les cas d'acrodermatite chronique atrophiante sont préférentiellement associés à l'infection par *B. afzelii*, les cas de neuroborréliose préférentiellement associés à *B. garinii*, et les cas d'arthrite seraient préférentiellement associés à *B. burgdorferi* sensu stricto. Ces associations ne sont pas absolues, voire discutées pour la dernière.

Fièvre récurrente épidémique à poux

Cette fièvre est due à *B. recurrentis* et est transmise d'homme à homme par les poux de corps, *Pediculus humanus corporis*. L'homme semble constituer le seul réservoir naturel de ces spirochètes.

La contamination de l'homme se produit en général lors de l'écrasement du pou, entraînant la pénétration de l'hémolymphe du vecteur au niveau de la lésion de piqûre. Le grattage favorise la contamination. La fièvre récurrente épidémique à poux est cosmopolite. Elle est favorisée par la pauvreté, les mauvaises conditions d'hygiène, la promiscuité, les états de catastrophe (camps de réfugiés). En juillet-août 2015, des cas importés par des migrants d'Afrique de l'Est (Érythrée, Somalie, Éthiopie) ont été notifiés – quelques cas en Allemagne et aux Pays-Bas. C'est également une pathologie potentielle des sans domicile fixe des villes des pays industrialisés.

Fièvres récurrentes endémiques à tiques

Ce sont des fièvres non contagieuses, dues à des *Borrelia* du groupe des fièvres récurrentes transmises à l'homme par des *Argasidae* et des *Ornithodoros* (Fig. 33.3). Ces tiques vivent dans les terriers des rongeurs qui constituent leur réservoir, sauf pour *B. duttonii* dont le seul réservoir connu est l'homme. Certaines de ces tiques sont domestiques, comme *Ornithodoros moubata*, vecteur de *B. duttonii*. La contamination de l'hôte par le vecteur est réalisée par l'injection de salive ou de liquide coxal relargué à proximité de l'orifice buccal, au site lésionnel de la piqûre.

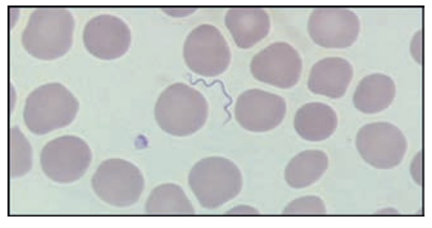


Fig. 33.3 Photographie de *Borrelia* de fièvre récurrente. *Source : L. Zilliox, CNR Borrelia, Strasbourg (2014).*

Les différentes espèces de *Borrelia* responsables des fièvres récurrentes à tiques sont associées à différentes espèces de tiques de répartition géographique bien spécifique, notamment en Afrique, le long du bassin Méditerranéen, au Moyen-Orient, en Amérique du Nord et en Amérique du Sud.

Plus récemment, une nouvelle espèce *Borrelia miyamotoi* a été identifiée comme agent de fièvre récurrente au sein des tiques dures du genre *Ixodes*, le même vecteur qui transmet les agents de la borréliose de Lyme. Elle a été décrite pour la première fois en 1995 au Japon chez *Ixodes persulcatus*. Cette espèce a été ultérieurement reconnue comme un pathogène humain. Le premier cas humain a été décrit récemment en Russie en 2011. En 2013, le premier cas humain a été rapporté aux Pays-Bas chez un patient profondément immunodéprimé. La fréquence de cette infection semble comparable ou inférieure à celle de la babésiose ou l'anaplasmose granulocytaire humaine. Bien que ce pathogène soit peu fréquent, il semblerait qu'il bénéficie d'une transmission transovarienne chez les vecteurs, contrairement aux espèces du complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Depuis 2013, le Centre national de référence (CNR) *Borrelia* étudie le taux d'infestation d'*Ixodes ricinus* en Alsace, zone de forte endémie pour les pathologies transmises par les tiques. Actuellement, aucun cas humain de fièvre récurrente à *B. miyamotoi* n'a encore été décrit en France à l'été 2015.

Clinique

Borréliose de Lyme (Tableau 33.2)

L'infection initiale locale consiste en la multiplication initiale cutanée de *B. burgdorferi* sensu lato. Elle se manifeste par un érythème migrant centrifuge, centré par le point de piqûre de la tique. C'est la manifestation clinique pathognomonique de la borréliose de Lyme. Elle pose le diagnostic à elle seule. Cet érythème est cependant inconstant et sa fréquence après piqûre de tique est variable. Son délai moyen d'apparition est de 28 jours ± 10 jours. L'érythème migrant (EM) ne doit pas être confondu avec la réaction érythémateuse locale qui apparaît en quelques heures, due à la piqûre elle-même. L'EM peut durer plusieurs semaines à plusieurs mois et atteindre un diamètre de plusieurs dizaines de centimètres. Son aspect typique est en cocarde, à centre clair et à bord érythémateux net. Il va s'amender, même en l'absence de traitement, mais les spirochètes peuvent persister plus longtemps dans le derme. À ce stade local, l'antibiothérapie réduit fortement la durée de l'évolution de l'EM, prévient les complications et peut bloquer le développement de la réponse humorale si le traitement est précoce. En l'absence de traitement, environ 10 % des EM évoluent en Europe vers une infection disséminée.

L'infection disséminée survient après une bactériémie très transitoire et habituellement non détectable, asymptomatique ou paucisymptomatique (signes généraux à type de syndrome pseudogrippal modéré). Elle s'exprime par des tableaux cliniques variés selon la localisation tissu-

Tableau 33.2 **Critères de définition de cas des différentes manifestations cliniques de la borréliose de Lyme en Europe (EUCALB, 2010–2011).**

Terme	Définition des cas cliniques	Critères biologiques essentiels	Critères biologiques/cliniques complémentaires
Érythème migrant (EM)	Macule extensive centrifuge rouge ou violette (≥5 cm de diamètre)*, s'éclaircissant ou pas au centre, à bord typiquement plus marqué et peu surélevé	Aucun	Détection de *B. bugdorferi* sensu lato par culture et/ou par PCR sur biopsie cutanée
Lymphocytome borrélien (rare)	Nodule ou plaque violacé(e) indolore, typiquement situé sur le lobe ou le pavillon de l'oreille, sur le mamelon ou sur le scrotum. Plus fréquent chez les enfants (surtout à l'oreille) que chez les adultes	Séroconversion ou sérologie positive Histologie en cas de doute	– Histologie – Détection de *B. bugdorferi* sensu lato par culture et/ou par PCR sur biopsie cutanée – EM récent ou concomitant
Acrodermatite chronique atrophiante	Lésions persistantes rouges ou violacées, situées typiquement sur les surfaces d'extension aux extrémités. Les lésions peuvent être initialement inflammatoires, puis devenir atrophiques. la peau peut s'indurer ou présenter des nodules fibroïdes en regard de proéminences osseuses	Taux élevé d'anticorps IgG spécifiques	– Histologie – Détection de *B. bugdorferi* sensu lato par culture et/ou par PCR sur biopsie cutanée
Neuroborréliose	Chez l'adulte principalement, méningoradiculite, avec ou sans paralysie faciale ; rarement encéphalite, myélite ; très rarement vascularite cérébrale Chez les enfants, principalement méningite et paralysie faciale	Pléiocytose et mise en évidence d'une synthèse intrathécale d'Ac spécifiques**	– Détection de *B. bugdorferi* sensu lato dans le LCR par culture et/ou par PCR – Synthèse intrathécale d'IgM et/ou d'IgG et/ou d'IgA totales dans le LCR – Présence d'anticorps spécifiques dans le sérum – EM récent ou concomitant
Arthrite de Lyme	Poussées récurrentes ou persistantes d'arthrite avec épanchement d'une ou de plusieurs grosses articulations. Les autres tableaux articulaires doivent être exclus	Présence d'IgG sériques spécifiques, habituellement à taux élevé***	Détection de *B. bugdorferi* sensu lato par culture et/ou par PCR sur tissu et/ou liquide synovial
Cardite de Lyme (rare)	Apparition aiguë de troubles de la conduction atrioventriculaire (bloc atrioventriculaire 2e ou 3e degré), troubles du rythme, occasionnellement myocardite ou pancardite. Les autres tableaux cardiaques doivent être exclus	Présence d'anticorps spécifiques sériques**	– Détection de *B. bugdorferi* sensu lato par culture ou par PCR sur biopsie endomyocardique – EM et/ou désordres neurologiques récents ou concomitants
Manifestations oculaires (rare)	Conjonctivite, uvéite, papillite, episclérite, kératite	Présence d'anticorps spécifiques sériques**	– Manifestations de borréliose de Lyme récentes ou concomitantes – Détection de *B. bugdorferi* sensu lato par culture et/ou par PCR sur humeur aqueuse

* Si le diamètre est inférieur à 5 cm, un antécédent de piqûre de tique, un délai d'apparition (après la piqûre de tique) d'au moins 2 jours et un érythème extensif à partir de la lésion de piqûre sont requis.

** La synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques peut manquer dans les formes très précoces.

*** Les taux d'anticorps spécifiques peuvent augmenter au cours de l'évolution de l'infection, ou décroître après élimination du processus infectieux. Des prélèvements réalisés à 3 mois d'intervalle peuvent être utiles pour objectiver un changement de ces taux d'anticorps spécifiques. Les prélèvements initiaux et de suivi doivent être analysés en parallèle pour éviter des variations interessais.

laire des spirochètes (neurologiques, articulaires, cutanés, cardiaques, oculaires ou musculaires principalement) qui peuvent apparaître en quelques semaines à quelques mois.

Les tableaux neurologiques, ou neuroborrélioses aiguës sont, en Europe, les manifestations les plus fréquentes du stade secondaire de la borréliose de Lyme. Celles-ci peuvent se traduire par des atteintes radiculaires sensitives, dysesthésies systématisées dans le territoire de la piqûre de tique. Ces douleurs sont volontiers nocturnes, peu sensibles aux antalgiques et aux anti-inflammatoires non stéroïdiens. Les méningites lymphocytaires sont aussi des manifestations très fréquentes des neuroborrélioses. Elles sont souvent modérées, paucisymptomatiques, à type de céphalées sans raideur méningée, et peuvent régresser spontanément. La méningo-radiculonévrite constitue la forme complète typique de cette atteinte neurologique. Des atteintes purement périphériques, polyneuropathiques, ont été observées. Chez l'enfant, la paralysie faciale est la plus fréquente des atteintes des nerfs crâniens.

Les atteintes rhumatologiques sont caractérisées le plus souvent par des monoarthrites ou oligoarthrites asymétriques des grosses articulations (genou, coude). Elles sont inflammatoires, peu douloureuses. Elles apparaissent en 1 à 6 mois et évoluent par poussées récurrentes brèves de quelques semaines, entrecoupées de phases de rémission de plus en plus longues au fil du temps. Des arthralgies diffuses peuvent survenir à n'importe quel stade de la maladie. Elles sont associées à d'autres manifestations évocatrices. Il est à noter que, si elles sont isolées, elles sont insuffisantes pour poser le diagnostic de borréliose de Lyme.

Des tableaux cliniques moins fréquents existent et sont représentés par les manifestations cutanées secondaires, telles que l'érythème migrant multiple et le lymphocytome borrélien (lésion nodulaire brun-jaune à violacée au niveau du lobe de l'oreille, du mamelon, ou du scrotum). Plus rarement, des atteintes oculaires (conjonctivites, kératites, uvéites notamment), des troubles de la conduction cardiaque, à type de bloc atrioventriculaire plus ou moins sévère, peuvent apparaître quelques semaines après l'inoculation. Les péricardites ou myocardites sont également très rares, ainsi que les myosites.

Les protocoles thérapeutiques sont les mêmes qu'à la phase d'infection localisée, sauf en cas de neuroborréliose ou de bloc atrioventriculaire où les céphalosporines de 3e génération en administration parentérale sont plus fréquemment utilisées en première intention.

L'infection peut, en l'absence de traitement, devenir chronique et succéder aux manifestations disséminées. Il peut s'agir d'arthrite chronique évoluant depuis plus de 1 an, sans rémission. Les manifestations neurologiques chroniques peuvent se traduire par des neuropathies axonales (paresthésies des extrémités, radiculopathies asymétriques). Des manifestations neurologiques centrales pures (troubles de l'attention, troubles mnésiques, signes d'irritation pyramidale) sont possibles et de diagnostic difficile. Enfin, l'acrodermatite chronique atrophiante (ou maladie de Pick-Herxheimer) peut survenir plusieurs années après l'inoculation. Elle évolue lentement en deux phases : une phase initiale infiltrative (érythème violacé, œdémateux, mou, sans augmentation de chaleur locale) à la face d'extension des membres (dos des mains, coudes, chevilles ou genoux) ; puis, en l'absence de traitement, une phase chronique atrophique (épiderme aminci sans œdème) qui laisse apparaître le réseau vasculaire. Au stade d'acrodermatite chronique atrophiante, comme en cas d'autres manifestations chroniques, la sérologie est toujours très fortement positive. Le traitement de ces phases d'infections chroniques repose essentiellement sur l'utilisation des céphalosporines de 3e génération pendant plusieurs semaines.

Fièvre récurrente épidémique à poux

Cette infection est généralement sévère. Son caractère épidémique est le reflet de la transmission interhumaine des ectoparasites infectés par *B. recurrentis*. Elle associe le plus souvent fièvre brutale, douleurs diffuses (myalgies), toux, signes méningés, hyperhémie conjonctivale, adénopathies, hépatosplénomégalie et ictère. Les accès fébriles durent en moyenne 6 jours et sont entrecoupés de rémission de 7 jours. On peut compter 1 à 5 récurrences fébriles. La gravité de cette infection réside dans l'apparition de complications surtout neurologiques avec convulsions, déficits moteurs et coma, mais aussi parfois de complications cardiaques et hémorragiques. En l'absence de traitement, la létalité de la fièvre récurrente épidémique à poux est élevée (10 à 40 %). Lors du traitement, la survenue d'une réaction de Jarrish-Herxheimer, liée à la lyse de la charge importante en spirochètes, à la différence de la borréliose de Lyme, complique souvent l'évolution.

Fièvres récurrentes endémiques à tiques

Ces infections sont habituellement bruyantes. Leur incubation varie de 2 à 18 jours après la piqûre de tique. Elle s'exprime brutalement par une fièvre élevée à 40 à 41 °C, avec frissons, douleurs diffuses, signes digestifs et neurologiques. La raideur méningée et l'hépatosplénomégalie sont des signes cliniques majeurs. Après 3 à 5 jours, la fièvre chute soudainement, laissant place aux sueurs et à l'abattement. La rate diminue de volume. Les rémissions durent 7 à 9 jours, puis les accès fébriles récidivent suivis de phases d'apyrexie. Ces récurrences sont très évocatrices du diagnostic. Selon les espèces de *Borrelia*, on compte 9 à 15 récurrences. Au fil du temps, les récurrences sont moins intenses. Chaque épisode fébrile reflète une bactériémie importante, jusqu'à 10^{7} bactéries/ml. Les récurrences sont liées à la variation antigénique des protéines de membrane externe de ces *Borrelia*. Chaque résolution est la conséquence du développement d'anticorps spécifiques contre un sérotype donné, et chaque récidive est la conséquence de l'émergence d'un nouveau sérotype. Entre les épisodes, les spirochètes sont présents dans certains organes et notamment dans les structures du système nerveux central, siège de complications dans moins de 5 % des cas. La sévérité est fonction de l'espèce en cause, de l'inoculum, du terrain. Lorsque l'infection survient pendant la grossesse, le risque d'avortement est élevé (50 %). Les complications sont liées à la présence de micro-embolies viscérales, par formation de rosettes érythrocytaires autour des spirochètes. Sans traitement, la létalité de ces infections est aux environs de 2 à 5 %.

Le traitement des fièvres récurrentes repose sur l'administration de tétracyclines en deux prises par jour ou de pénicilline G, pendant 10 jours. Dans les formes compliquées d'atteintes neurologiques, la ceftriaxone est utilisée.

Les symptômes des infections à *B. miyamotoi* allient ceux des fièvres récurrentes, avec un syndrome pseudo-grippal précoce et parfois sévère après piqûre de tique (fièvre, fatigue, céphalées, myalgies, arthralgies), et ceux de la borréliose de Lyme, notamment avec le développement d'un érythème migrant (10 % des cas) et d'une méningo-encéphalite. Ces symptômes s'amendent en une semaine après le début de l'antibiothérapie. Les traitements proposés sont la doxycycline en l'absence de complication ou la ceftriaxone en cas de méningo-encéphalite. L'infection à *B. miyamotoi* devrait être évoquée en cas d'accès fébriles aigus chez des patients ayant été exposés aux tiques dans les régions de forte endémie de la borréliose de Lyme.

Caractères bactériologiques

Les dimensions des *Borrelia* sont de l'ordre de 4 à 30 μm de long et 0,2 à 0,5 μm de large. Ce sont des bactéries chimio-organotrophes qui utilisent comme seule source de carbone des hydrates de carbone et des acides aminés. Elles sont classiquement micro-aérophiles. Leur membrane externe a une structure trilamellaire. La membrane externe des *Borrelia* comprend des polypeptides et lipoprotéines en abondance, mais ne contient pas de LPS. La faible densité de protéines transmembranaires confère une fragilité particulière aux *Borrelia*. Ainsi, contrairement aux bactéries à Gram négatif, ces spirochètes ne résistent que faiblement aux contraintes physiques (centrifugation, mise en suspension) et chimiques (détergents). Contrastant avec la faible densité de protéines transmembranaires, la présence de nombreuses protéines de surface contribue à fournir une capacité d'adaptation de ces bactéries au vecteur et à l'hôte.

Cette membrane externe circonscrit l'espace périplasmique qui contient de 7 à 20 flagelles. Ces derniers sont enroulés autour du cylindre protoplasmique, compartiment le plus interne, et sont fixés en position subterminale. Ces flagelles permettent aux spirochètes de se déplacer, notamment dans un environnement visqueux.

Le cylindre protoplasmique des *Borrelia* renferme un chromosome linéaire et de nombreux plasmides circulaires et linéaires. Ce matériel génétique est inhabituel, car la plupart des bactéries ont un chromosome circulaire. La taille du génome de *B. burgdorferi* sensu lato est de 1,5 mégabase dont 0,9 mégabase pour le chromosome. Le GC % moyen est de 28,6 %. Ce taux faible de guanine-cytosine différencie le genre *Borrelia* des genres *Leptospira* et *Treponema* où il varie de 35 à 53 %.

Diagnostic bactériologique

Aspects préanalytiques

La recherche directe de *B. burgdorferi* sensu lato est réalisée sur biopsies et liquides. La biopsie de peau doit être prélevée au site lésionnel de l'érythème migrant à la phase primaire, du lymphocytome borrélien à la phase secondaire, ou de l'acrodermatite chronique atrophiante à la phase tardive. C'est le prélèvement qui permet le plus souvent la mise en évidence des spirochètes (par culture et/ou par amplification génique in vitro). En cas d'érythème, la biopsie est prélevée en bordure de la lésion. En pratique, le prélèvement doit être réalisé en respectant strictement les règles d'asepsie, qui diminuent le risque de contamination de la culture par les bactéries de la flore cutanée. Une *punch-biopsy* de 2 à 4 mm est suffisante. Pour la culture, le tissu doit être ensemencé immédiatement en milieu liquide spécifique BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) au lit du patient. Pour les analyses par biologie moléculaire, le transport au laboratoire peut s'effectuer soit dans le milieu BSK à température ambiante, soit dans quelques gouttes de sérum physiologique à +4 °C en moins de 24 heures, ou à –80 °C si le délai est plus long.

En cas de neuroborréliose aiguë ou chronique, la recherche directe par culture ou amplification génique de *B. burgdorferi* sensu lato dans le LCR n'est pas d'une grande sensibilité (inférieure à 30 % en moyenne) et n'a d'intérêt qu'au tout début de la neuroborréliose aiguë. Le conditionnement du LCR en vue de la culture est alors similaire à celui de la peau. Pour la recherche par amplification génique in vitro, le LCR est acheminé tel quel au laboratoire, à +4 °C, en moins de 24 heures, ou transporté congelé puis conservé à –80 °C si le délai est plus long. Le LCR est surtout utilisé pour mettre en évidence une pléiocytose et la présence d'anticorps anti-*Borrelia* spécifiques.

En cas d'arthrite de Lyme, le liquide synovial et/ou la biopsie synoviale de l'articulation atteinte sont à prélever en respectant les règles d'asepsie. Le conditionnement de ces prélèvements en vue de la culture mais surtout de l'amplification génique in vitro est à réaliser comme décrit précédemment pour la peau. Dans le liquide synovial, il est possible de détecter la présence d'anticorps anti-*Borrelia* spécifiques, mais cet examen apporte peu d'information supplémentaire par rapport à la sérologie sanguine.

La culture de *B. burgdorferi* sensu lato à partir du sang est possible, mais de faible rendement en Europe (sensibilité : 40 % aux États-Unis, < 10 % en Europe) car la dissémination sanguine de *B. afzelii*, espèce majoritaire en Europe, est peu fréquente. En phase de dissémination systémique, on estime qu'il y a environ 0,1 *B. burgdorferi* sensu lato/ml dans le sang total. La mise en évidence de *B. burgdorferi* sensu lato dans le sang, le plasma ou le sérum nécessite ainsi un volume important de sang analysé (> 20 ml).

Le diagnostic des fièvres récurrentes à poux ou à tiques repose sur l'examen direct du sang prélevé lors des accès fébriles. Pour cela, le sang doit être prélevé sur anticoagulant (EDTA ou tube citraté) et acheminé très rapidement au laboratoire.

Diagnostic direct

Examen direct

La mise en évidence directe de *B. burgdorferi* sensu lato, à l'état frais, ou après fixation et coloration, est en théorie possible, mais n'est pas réalisée en pratique courante. En effet, les techniques d'examen direct souffrent d'un manque de spécificité et d'un fort manque de sensibilité car la charge bactérienne tissulaire et dans les liquides de ponction est extrêmement faible. De même, l'immunofluorescence directe manque de sensibilité et n'est pas utilisée en pratique.

À l'inverse, l'examen microscopique représente la méthode diagnostique la plus courante pour les fièvres récurrentes et présente une sensibilité satisfaisante pour ces *Borrelia.* La recherche des spirochètes est généralement réalisée dans le sang, sur frottis fin coloré au Giemsa, ou au microscope à fond noir. Outre le Giemsa, d'autres colorations telles que l'acridine orange peuvent être employées.

Culture

En dépit de sa faible valeur prédictive négative, la culture de *B. burgdorferi* sensu lato à partir de prélèvements de patients est toujours considérée comme la technique de référence pour le diagnostic biologique des formes cutanées de la borréliose de Lyme car elle montre la présence de bactéries viables. Si sa sensibilité peut avoisiner les 70 à 80 % dans les biopsies d'érythème migrant de patients américains, elle est bien moindre dans le LCR (17 %) et les autres liquides biologiques (liquide synovial, sang).

La culture in vitro de *B. burgdorferi* sensu lato nécessite un milieu spécifique riche, le milieu liquide de Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) modifié plusieurs fois afin d'améliorer le rendement de la culture. Un milieu BSK standardisé est disponible dans le commerce (Sigma), sous le nom de BSK-H®. À 32 à 34 °C, le temps de génération de *B. burgdorferi* sensu lato est en moyenne de 7 à 20 heures. Pour cette raison, le délai de positivité d'une culture à partir d'un prélèvement humain est souvent de l'ordre de 10 à 20 jours ; les cultures doivent être observées au moins une fois par semaine et conservées au moins 8 semaines avant de conclure à la négativité de la culture. Soixante-dix pour cent des biopsies cutanées positives en culture de patients présentant un érythème migrant sont détectées en 2 semaines. Ce taux s'élève à 95 % en 4 semaines.

En pratique, la mise en évidence directe par culture de *B. burgdorferi* sensu lato à partir de biopsies ou de liquides doit être réalisée sur des échantillons prélevés avant tout traitement antibiotique, avec ensemencement immédiat sur milieu BSK additionné d'antibiotique(s) (rifampicine, polymyxine, vancomycine, néomycine), pour limiter le risque de contamination par la flore commensale du patient, notamment par la flore cutanée. La culture doit être maintenue entre 32 à 34 °C et observée systématiquement une fois par semaine en microscopie optique à fond noir ou à contraste de phase car une culture positive ne trouble pas le milieu de culture. Les cultures sont repiquées à J + 15 en cas de négativité de la culture primaire.

Plus les prélèvements tissulaires ou liquidiens sont réalisés précocement dans l'évolution clinique (érythème migrant ou stade débutant de neuroborréliose aiguë) et plus ils sont riches en spirochètes, meilleures sont les chances de croissance de *B. burgdorferi* sensu lato en culture. Néanmoins, au stade d'acrodermatite chronique atrophiante, l'isolement de *B. burgdorferi* sensu lato est possible des années après l'apparition des lésions. L'identification de l'espèce de *Borrelia* en cause par typage moléculaire peut être réalisée sur souches ou directement par PCR sur le prélèvement de peau.

Les cultures et l'identification des *Borrelia* sont l'apanage de laboratoires spécialisés. En France, on peut s'adresser au CNR des *Borrelia*.

En résumé, la culture reste la méthode de référence pour la détection directe de *B. burgdorferi* sensu lato et son imputabilité dans les tableaux cliniques atypiques. Elle est relativement performante à partir de biopsies cutanées, mais manque très nettement de sensibilité quand elle est appliquée au LCR, au sang ou au liquide synovial. Ses indications principales, outre l'intérêt épidémiologique, sont les lésions érythémateuses atypiques de la phase précoce de l'infection. La culture a peu d'intérêt diagnostique dans les autres manifestations de la borréliose de Lyme.

La culture des *Borrelia* responsables des fièvres récurrentes est difficile elle aussi et n'est pas réalisée en pratique courante pour le diagnostic de ces infections. Pour l'isolement des *Borrelia* responsables de fièvres récurrentes, l'inoculation à la souris a été utilisée pendant longtemps. Actuellement, certaines espèces peuvent être cultivées sur milieu axénique comme celui utilisé pour cultiver *B. burgdorferi* sensu lato. Mais cette pratique reste l'apanage de laboratoires spécialisés.

Quelle que soit la souche de *Borrelia,* la culture peut permettre son isolement mais en aucun cas son identification, ni sur des caractères phénotypiques, ni sur des caractères culturaux (métabolisme réduit de *Borrelia*). Ce sont les méthodes génomiques (électrophorèse en champ pulsé, électrophorèse de fragments PCR, séquençage, MLST, MLSA, NGS) qui permettent actuellement en pratique d'identifier et de typer les différentes espèces de *Borrelia* responsables des fièvres récurrentes.

Techniques moléculaires de détection de *Borrelia*

Ces techniques reposent sur l'amplification génique in vitro par PCR. Elles permettent la détection mais également le typage des différentes espèces, notamment du complexe *B. burgdorferi* sensu lato.

Pour le diagnostic direct de la borréliose de Lyme, l'amplification génique se pratique sur les différents prélèvements (peau, sang, plasma, LCR, liquides internes et tissus). Les cibles sont chromosomiques (*rRNA*, *flaB*, *recA*, *p66*), ou plasmidiques (*ospA*, *ospB*). La mise en œuvre de ces techniques nécessite une validation précise et demeure actuellement réservée aux laboratoires spécialisés. Quelques coffrets commerciaux sont disponibles, mais ils manquent d'évaluation et cet acte n'est actuellement pas inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale.

En général, la sensibilité des méthodes d'amplification génique in vitro est similaire à celle de la culture pour les biopsies cutanées d'érythème migrant, mais la PCR a l'avantage de fournir rapidement un résultat, de s'affranchir des problèmes de contamination par la flore cutanée et de simplifier le mode de transport des échantillons.

La sensibilité de la PCR est faible dans les liquides comme le sang ou le LCR, bien que, pour les neuroborrélioses aiguës très récentes, cette sensibilité puisse atteindre 50 %. C'est dans les manifestations cutanées secondaires (lymphocytome borrélien) et tardives (arthrite, acrodermatite chronique atrophiante [ACA]) que la PCR est la plus intéressante. Ainsi, en cas d'ACA, la sensibilité de la PCR est supérieure à 60 % alors que la sensibilité de la culture est inférieure à 10 % dans certaines séries. En cas d'arthrite de Lyme, la sensibilité de la PCR est de même très nettement supérieure à celle de la culture pour les prélèvements de tissu synovial. Des faux négatifs sont néanmoins possibles par suite à un trop faible nombre

de spirochètes présents dans l'échantillon ou par inhibition de la réaction d'amplification. La recherche d'inhibiteur par contrôle interne est donc indispensable ainsi que l'utilisation de témoins positifs et négatifs.

Pour la détection à visée diagnostique des *Borrelia* responsables de fièvres récurrentes, les tests PCR développés sont rares. Cela tient en partie au caractère très occasionnel et très localisé de ces infections en Europe. Ces tests ne sont également pratiqués que par les laboratoires spécialisés.

À côté des techniques moléculaires de détection, les méthodes moléculaires de typage ont permis, notamment pour les *Borrelia* du complexe *burgdorferi* sensu lato, d'établir de solides bases taxonomiques. Sur ces bases ont été développées des techniques de PCR permettant l'identification de l'espèce infectante sans culture préalable, par l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques d'espèce. Ces techniques, intéressantes d'un point de vue épidémiologique, ne sont pas utilisées en pratique courante pour le diagnostic de la borréliose de Lyme.

Diagnostic indirect

Le diagnostic des fièvres récurrentes à *Borrelia* ne fait pas appel à ces techniques, de moindre intérêt compte tenu du caractère relativement aigu de ces infections. Cependant, des tests sérologiques immuno-enzymatiques ont été développés avec la protéine recombinante GlpQ, commune aux *Borrelia* de fièvres récurrentes et absentes chez *Borrelia burgdorferi* sensu lato et chez *Treponema*. Ces tests ne sont pas encore proposés en tests commercialisés. Ils doivent aussi être évalués afin de déterminer leur place par rapport aux techniques directes.

Pour les raisons précédemment évoquées, les techniques sérologiques sont, à l'inverse, au premier plan du diagnostic des infections par *Borrelia burgdorferi* sensu lato, notamment dans les formes disséminées et tardives.

En pratique courante, la sérologie n'a pas d'indication au stade d'érythème migrant car elle a une sensibilité ≤ 50 % à ce stade de la maladie. Elle ne doit donc pas être réalisée à ce stade car le risque de faux négatifs est très élevé. Au stade disséminé, les signes cliniques des formes secondaires ne sont pas très spécifiques et la mise en évidence directe des *Borrelia* est peu sensible à ce stade. En revanche, l'infection à *Borrelia* induit une réponse immunitaire humorale spécifique de l'hôte qui s'intensifie au cours du temps. La confirmation d'une suspicion clinique de la borréliose de Lyme au stade secondaire ou tardif repose donc, presque par défaut, principalement sur la sérologie.

Les tests sérologiques permettent la détection d'anticorps spécifiques de l'hôte, dirigés contre les antigènes de *B. burgdorferi* sensu lato. Parmi ces antigènes, certains sont bien caractérisés :

- la flagelline (41 kDa), antigène immunodominant, qui engendre une réponse anticorps importante et précoce, quelques semaines après le début de l'infection. Mais la spécificité de cette réponse antiflagelline est faible à cause d'une antigénicité commune avec d'autres micro-organismes flagellés ou avec des structures de l'hôte (tissu nerveux, synovial, myocardique) ;
- la protéine de surface OspC (21 à 25 kDa), antigène immunodominant précoce. OspC est un facteur de virulence important qui entre en jeu dans l'infectivité et la capacité d'invasion de souches de *B. burgdorferi* sensu lato. Cette protéine est exprimée à la surface des spirochètes pendant la phase précoce de l'infection et la réponse IgM qu'elle engendre est un bon marqueur d'infection débutante ;
- les protéines immunogènes de surface OspA (31 kDa), OspB (34 kDa), qui sont exprimées par les spirochètes aux stades tardifs de l'infection. Elles génèrent des anticorps bactéricides. OspA a été à la base de la mise au point d'un vaccin humain actuellement retiré du marché. Ce vaccin, qui fut un temps commercialisé aux États-Unis car actif vis-à-vis de l'espèce *B. burgdorferi* sensu stricto uniquement, était soupçonné d'être potentiellement générateur d'effets secondaires dysimmunitaires ;
- la protéine VlsE (34 à 35 kDa), dont la séquence est codée par le plasmide linéaire lp28-1, qui possède une région invariable hautement immunogène conservée entre les espèces. Cet antigène est un bon candidat pour les tests sérologiques.

Les techniques sérologiques actuellement utilisées pour le diagnostic sérologique de la borréliose de Lyme se déclinent en deux groupes :

- d'une part les techniques dites de dépistage telles les techniques immuno-enzymatiques dont l'ELISA au premier plan, et l'immunochromatographie (IC) ;
- et d'autre part les techniques dites de confirmation, par immuno-empreinte, ou *immuno-blot* ou *Western-blot* (WB).

La démarche sérologique recommandée en France, comme dans de nombreux pays d'Europe (Conférence de Consensus 2006, Guidelines EUCALB), pour le diagnostic de la borréliose de Lyme comporte deux étapes : une première étape de dépistage, par ELISA en général, puis si le résultat est positif ou douteux, une deuxième étape de confirmation, par immuno-empreinte sur le même sérum. Pour une bonne interprétation sérologique, il est nécessaire à la phase aiguë d'analyser en parallèle deux prélèvements réalisés à 3 à 4 semaines d'intervalle, afin d'objectiver l'élévation du taux d'anticorps spécifiques.

Les normes minimales recommandées par l'European Concerted Action on Lyme Borreliosis (UCALB) sont : une spécificité de 90 % pour les tests de dépistage en ELISA et une spécificité de 95 % pour les tests de confirmation par immuno-empreinte (spécificité établie par analyse de la population où le test est utilisé pour le diagnostic des infections à *Borrelia burgdorferi* sensu lato).

La sensibilité des tests ELISA dans le sérum est en général inférieure à 50 % en cas d'érythème migrant. Sa négativité ne doit donc pas, à tort, faire rejeter ou retarder le diagnostic qui reste clinique, même avec la dernière génération de tests ELISA. La sensibilité de la sérologie augmente ensuite en quelques semaines après le début de l'infection.

Au stade de manifestation disséminée, la sensibilité est plus élevée dans les formes secondaires de la maladie (neuroborrélioses, atteintes cardiaques). Au stade de neuroborréliose aiguë, la sérologie peut être négative dans le sérum dans 5 à 20 % des cas et doit donc toujours être couplée à une sérologie dans le LCR au stade aigu de neuroborréliose. La séropositivité avoisine les 100 % dans les formes tardives

comme l'arthrite de Lyme ou l'acrodermatite chronique atrophiante. À ce stade, les IgG sont souvent très élevées, mais cela ne constitue pas un signe de gravité, de même que la persistance d'IgM. À l'inverse, une sérologie négative à ce stade de la maladie devra faire remettre en cause le diagnostic posé.

En cas de neuroborréliose aiguë ou chronique, les anticorps sont presque toujours détectés dans le LCR. Devant ce résultat, il conviendra d'éliminer un passage passif d'anticorps sériques anti-*Borrelia*. On affirmera le diagnostic de neuroborréliose en complétant l'examen par la recherche d'une synthèse intrathécale d'anticorps spécifiques. Cette recherche s'effectue en analysant en parallèle des échantillons de sérum et de LCR prélevés le même jour. La positivité de cette synthèse spécifique signe une neuroborréliose.

Le risque de faux positif est lié à des réactions croisées (certaines pathologies infectieuses comme les autres spirochétoses, la mononucléose infectieuse, les infections à herpès simplex, le paludisme ; les pathologies dysimmunitaires telles que le lupus, la présence d'anticorps anti-ADN natif, la présence de facteurs rhumatoïdes, etc.).

Après un traitement cliniquement efficace, la persistance pendant des mois voire des années d'anticorps spécifiques IgG et/ou IgM est fréquente mais est à considérer comme une cicatrice sérologique. Pour cette raison, un suivi sérologique n'est pas recommandé après traitement. La présence d'IgG cicatricielles d'une infection antérieure guérie ne protège pas contre une ré-infection à *B. burgdorferi* sensu lato. Les examens sérologiques spécifiques actuels ne permettent pas la distinction entre une infection active et une cicatrice sérologique.

L'immuno-empreinte, encore appelée *immuno-blot* ou *Western-blot*, est la technique utilisée pour la confirmation de la positivité de la sérologie de la borréliose de Lyme. Le principe de cette technique repose sur la séparation des antigènes de *B. burgdorferi* sensu lato en fonction de leur poids moléculaire, ce qui permet d'objectiver la spécificité des anticorps développés par les patients.

Les trousses commerciales utilisées comprennent soit des antigènes natifs de *B. burgdorferi* sensu lato, soit des protéines spécifiques recombinantes, soit une association des deux. Globalement, les techniques d'immuno-empreinte ont la même sensibilité que l'ELISA. Leurs limites sont liées au manque de standardisation des antigènes utilisés, aux critères d'interprétation ainsi qu'à la subjectivité éventuelle en cas de lecture visuelle des bandes

À la phase précoce de l'infection par *B. burgdorferi* sensu lato, la présence d'IgM dirigés contre OspC (21 kDa) et Fla (41 kDa) confirme la suspicion d'infection débutante. À la phase d'état de l'infection, l'apparition des IgG survient quelques semaines après l'apparition des IgM, d'où l'intérêt de l'analyse de deux sérums prélevés à plus de 3 semaines d'intervalle. Ces anticorps sont dirigés contre la flagelline et OspC. Les IgG peuvent également réagir contre les protéines de 83/100, 66, 45, 39, 35, 30 et 18 kDa. Des anticorps de type IgG dirigés contre un grand nombre d'antigènes sont typiquement observés dans les cas de neuroborréliose et de borréliose de Lyme tardive.

De nombreuses équipes ont proposé au fil des ans des critères de positivité pour leur test d'immuno-empreinte (Tableau 33.3). Pour cela, la majorité de ces auteurs prennent en compte à la fois le type et le nombre d'antigènes immunoréactifs. La disparité de ces critères est en partie le reflet du manque de standardisation de ces tests. Outre les différentes contingences techniques, la variabilité des souches utilisées en est également responsable. Aucune étude européenne multicentrique n'a réussi à définir des critères de positivité uniques universels en immuno-empreinte adaptés au diagnostic de la borréliose de Lyme en Europe. Différents critères de positivité européens sont cependant disponibles, qui doivent, avant d'être adoptés, être testés par chaque laboratoire selon les normes minimales techniques recommandées par l'EUCALB.

Les limites de l'immuno-empreinte sont liées à la subjectivité de la détection et de l'interprétation visuelle des bandes, d'où l'intérêt d'*immuno-blots* recombinants plus faciles à lire.

En pratique, la réalisation d'une immuno-empreinte est justifiée après un test ELISA positif ou douteux, pour confirmer le résultat, car la spécificité de l'immuno-empreinte est supérieure à celle de l'ELISA. Cependant, en zone d'endémie

Tableau 33.3 **Critères de positivité pour l'interprétation des immuno-empreintes, d'après la littérature.**

Référence	Technique d'analyse	Critères de positivité
Grodzicki, 1988	IE[1]	2 ou plusieurs bandes en IgM et/ou 2 ou plusieurs bandes en IgG, ou au moins une bande en IgG *et* au moins une bande en IgM parmi les antigènes suivants : P14, P18, P19, P21, P23, P25, P28, P31, P34, P39, P41, P55, P58, P66, P75 et P88
Dressler, 1993	IE, MAbs[2]	2 bandes en IgM parmi les antigènes suivants : P18, P21, P28, P37, P41, P45, P58 et P93 ; 5 en IgG parmi les antigènes suivants : P18, P21, P28, P30, P39, P41, P45, P58, P66 et P93
Engström, 1995	IE, MAbs	2 bandes en IgM, parmi les antigènes suivants : P24, P39 et P41 ; 2 bandes en IgG, parmi les antigènes suivants : P20, P24–22 forte, P35, P39 et P88
Norman, 1996	IE, MAbs	4 bandes parmi les 11 antigènes suivants : P18, P21, P23, P27, P31, P34, P39, P41, P66, P75 et P93 (protéines reconnues pour les trois espèces)

Hauser, 1998	IE, MAbs	Pour PKa2 (*B. burgdorferi* sensu stricto) : 1 bande au moins en IgG parmi les antigènes suivants : P17, P21, POspC, P56, P58 et P83-100; en IgM, la bande P41 forte ou au moins 1 bande parmi les antigènes suivants : P17, OspC et P39 Pour PKo (*B. afzelii*) : au moins 2 bandes en IgG parmi les antigènes suivants : P14, P17, P21, OspC, P30, P39, P43, P58 et P83-100; en IgM, une bande P41 forte ou au moins 1 bande parmi les antigènes suivants : P17, OspC, P39 PBi (*B. garinii*) : au moins 1 bande en IgG parmi les antigènes suivants : P17, P21, OspC, P39 et P83-100. En IgM, une bande P41 forte ou au moins 1 bande parmi OspC et P39
Robertson, 2000	IE, MAbs	7 règles d'interprétation en fonction de la souche utilisée, 2 à 3 bandes en général, en IgM les antigènes P41 et OspC sont importants, en IgG certains des antigènes suivants : P17, OspC, P39, P41, P43 et P58 P83/100 sont pris en compte, selon la souche utilisée
Liu, 2013	IE	Au moins 1 bande parmi les antigènes P83/100, P58, P39, OspB, OspA, P30, P28, OspC, P17 et P14 en IgG test ET au moins une bande parmi les antigènes P83/100, P58, P39, OspA, P30, P28, OspC, P17 et P41 en IgM.

[1] IE : immuno-empreinte.
[2] MAbs : calibration par anticorps monoclonaux.

de la borréliose de Lyme, son interprétation est difficile car la méthode met en évidence une séroprévalence élevée chez les sujets sains. En cas de négativité des tests ELISA, c'est-à-dire en l'absence d'anticorps en quantité détectable avec un test ELISA bien conduit, il n'est pas utile de réaliser un test d'immuno-empreinte. En revanche, en cas de manifestation disséminée précoce, un suivi sérologique à 3 semaines peut être utile.

D'autres méthodes, comme les tests de transformation lymphocytaire pour le diagnostic de la borréliose de Lyme, ont été proposées par certains laboratoires. Leur utilité diagnostique n'a cependant pas été démontrée à ce jour.

Traitement

Le traitement de la borréliose de Lyme est fonction du stade de l'infection pour la durée et l'antibiotique utilisé. À la phase précoce, l'amoxicilline ou les cyclines telles que la doxycycline (200 mg/j pendant 2 semaines) sont utilisées. Chez l'enfant, une pénicilline sera préférée comme l'amoxicilline (50 mg/kg/j pendant 3 jours). Devant une forme sévère, une céphalosporine de troisième génération (ceftriaxone) à raison de 2 g/j durant 3 semaines sera privilégiée. En cas d'allergie aux pénicillines, parmi les macrolides, l'azithromycine peut être prescrite. Des recommandations thérapeutiques ont été établies au niveau européen (Tableau 33.4).

La prophylaxie de la borréliose de Lyme réside dans la lutte contre les piqûres de tique. Le port de vêtements clairs couvrants protecteurs lors d'excursion en forêt surtout en période estivale est efficace. Les répulsifs par vaporisation sur la peau ou les vêtements peuvent être utiles, mais ne sont pas recommandés chez les enfants. Après l'excursion, l'examen soigneux corporel est l'élément essentiel de la prévention permettant d'enlever la tique le plus rapidement possible, sans l'écraser et en désinfectant soigneusement la lésion de piqûre.

Les *Borrelia* responsables de fièvres récurrentes sont en général très sensibles aux antibiotiques. Le traitement repose sur les tétracyclines en deux prises par jour ou la pénicilline G pendant 10 jours. L'érythromycine peut aussi être utilisée. La mise en route du traitement peut engendrer une réaction de Jarish-Herxheimer, quasi constante dans la fièvre récurrente à poux, variable dans le cas des fièvres récurrentes à tiques, mais proportionnelle à la gravité de l'infection. Cette réaction se manifeste par une exacerbation brutale et rapide des signes cliniques avec état de choc, fièvre, frissons, accélération du pouls et hypertension. Lors de cette réaction, les spirochètes s'agglutinent dans le sang, puis disparaissent. Survient alors la défervescence fébrile accompagnée de sueurs et d'hypotension. Le choc hypotensif peut être fatal.

La prophylaxie des fièvres récurrentes repose sur l'amélioration des conditions d'hygiène corporelle et vestimentaire, la lutte contre les ectoparasitoses, la dératisation associée à l'élimination des tiques.

Conclusion

Le diagnostic de la borréliose de Lyme repose, en pratique courante, sur des arguments cliniques et sérologiques, surtout lors des phases disséminées ou tardives de la maladie. Le diagnostic des fièvres récurrentes repose sur la confirmation bactériologique de la présence de spirochètes dans le sang par l'examen direct sanguin ou LCR après coloration de Giemsa.

Tableau 33.4 **Traitement de la borréliose de Lyme en Europe (d'après EUCALB).**

Tableaux cliniques et antibiotiques	Voie d'administration	Dose		Durée
		Adultes	*Enfants*	
Erythème migrant* et lymphocytome borrélien†				
Doxycycline‡	Orale	2 × 100 mg	Restrictions d'utilisation‡	14 jours (10–21 jours)
Amoxicilline	Orale	3 × 500–1000 mg	25–50 mg/kg	14 jours (10–21 jours)
Céfuroxime axétil	Orale	2 × 500 mg	30–40 mg/kg	14 jours (10–21 jours)
Pénicilline V	Orale	3 × 1,0–1,5 Mio	0,1–0,15 Mio/kg	14 jours (10–21 jours)
Azithromycine†	Orale	2 × 500 mg 1 × 500 mg	20 mg/kg 10 mg/kg	premier jour 14 jours suivants
Neuroborrélioses				
Ceftriaxone§	iv	2 g	50–100 mg/kg	14 jours (10–30 jours)
Pénicilline G	iv	20 Mio	0,25–0,5 Mio/kg	14 jours (10–30 jours)
Doxycycline‡	Orale	2 × 100 mg ou 200 mg	Restrictions d'utilisation‡	21 jours (14–30 jours)
Arthrites (intermittentes ou chroniques) et cardioborrélioses§				
Doxycycline‡	Orale	2 × 100 mg	Restrictions d'utilisation‡	21 jours (14–30jours)
Amoxicilline	Orale	3 × 500–1000 mg	25–50 mg/kg	21 jours (14–30 jours)
Ceftriaxone§	IV	2 g	50–100 mg/kg	21 jours (14–30 jours)
Acrodermatite chronique atrophiante				
Ceftriaxone§	IV	2 g	50–100 mg/kg	21 jours (14–30 jours)
Doxycycline‡	Orale	2 × 100 mg	Restrictions d'utilisation‡	21 jours (14–30 jours)
Amoxicilline	Orale	3 × 500–1000 mg	25–50 mg/kg	21 jours (14–30 jours)

IV = intraveineuse ; Mio = million d'unités ; pénicilline V = phénoxyméthylpénicilline.
* Traitement en cas d'é*rythèmes migrants multiples* (*secondaires, EM récidivant*) comme pour la *neuroborréliose aiguë.*
† L'azithromycine est principalement considérée comme un traitement alternatif pour les enfants, les femmes enceintes et les femmes allaitantes qui sont allergiques à la pénicilline.
‡ La doxycycline ne doit pas être utilisée chez les enfants de moins de 8 ans (12 ans dans certains pays), ni chez les femmes enceintes et les femmes allaitantes.
§ D'autres céphalosporines de troisième génération comme le céfotaxime sont aussi actives.

Pour en savoir plus

Ang CW, Notermans DW, Hommes M, et al. Large differences between test strategies for the detection of anti-Borrelia antibodies are revealed by comparing eight ELISAs and five immunoblots. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011 ; 30(8) : 1027–32.

Barbour AG. Relapsing fever and other Borrelia infections. In : Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, editors. Tropical infectious diseases : principles, pathogens, and practice. Philadelphia : Churchill Livingstone ; 1999. p. 535–46.

Barbour AG, Hayes SF. Biology of Borrelia species. Microbiol Rev 1986 ; 50 : 381–400.

Brouqui P, Stein A, Dupont HT, et al. Ectoparasitism and vector-borne diseases in 930 homeless people from Marseilles. Medicine (Baltimore) 2005 ; 84 : 61–8.

Blanc F, Jaulhac B, Fleury M, et al. Relevance of the antibody index to diagnose Lyme neuroborreliosis among seropositive patients. Neurology 2007 ; 69 : 953–8.

Borréliose de Lyme : démarches diagnostiques, thérapeutiques et préventives. 16e Conférence de Consensus de la SPILF Med Mal Infect 2007 ; 37 : 187–93.

Cutler SJ. Relapsing fever--a forgotten disease revealed. J Appl Microbiol 2010 ; 108(4) : 1115–22.

Dessau RB, Fingerle V, Gray J, et al. The lymphocyte transformation test for the diagnosis of Lyme borreliosis has currently not been shown to be clinically useful. Clin Microbiol Infect 2014 ; 20 : 786–7.

Euzeby JP. www.bacterio.cict.fr/b/borrelia.html.

Goldenberger D, Claas GJ, Bloch-Infanger C, et al. Louse-borne relapsing fever (Borrelia recurrentis) in an Eritrean refugee arriving in Switzerland, August 2015. Euro Surveill 2015 ; 20(32) : 13.

Hansmann Y, Leyer C, Lefebvre N, et al. Feedback on difficulties raised by the interpretation of serological tests for the diagnosis of Lyme disease. Med Mal Infect 2014 ; 44 : 199–205.

Hovius JW, de Wever B, Sohne M, et al. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete Borrelia miyamotoi in Europe. Lancet 2013 ; 382(17) : 658.

Hunfeld KP, Kraiczy P. When to order a western-blot and how should it be interpreted ? Curr Probl Dermatol 2009 ; 37 : 167–77.

Krause PJ, Fish D, Narasimhan S, et al. Borrelia miyamotoi infection in nature and in humans. Clin Microbiol Infect 2015 ; 21 : 631–9.

Lipsker D, Jaulhac B. Lyme borreliosis. Biological and clinical aspects. Curr Probl Dermatol. Basel Karger 2009 ; 37 : 18–30.

Postic D, Baranton G. Borrelia. In : Actualités permanentes en bactériologie clinique. Section IX 5 : Bactéries d'identification difficile et/ou inhabituelles. Paris : ESKA ; 2002.

Rapports d'activité. Centre national de référence des Borrelia. InVS ; 2003–2014.

Rebaudet S, Parola P. Epidemiology of relapsing fever borreliosis in Europe. FEMS Immunol Med Microbiol 2006 ; 48 : 11–5.

Rollend L, Fish D, Childs JE. Transovarial transmission of Borrelia spirochetes by Ixodes scapularis : a summary of the literature and recent observations. Ticks Tick Borne Dis 2013 ; 4(1-2) : 46–51.

Schramm F, Grillon A, De Martino S, et al. La borréliose de Lyme. Rev Fr des Laboratoires 2013 ; 457 : 35–49.
Stanek G, Lusa L, Ogrinc K, et al. Intrathecally produced IgG and IgM antibodies to recombinant VlsE, VlsE peptide, recombinant OspC and whole cell extracts in the diagnosis of Lyme neuroborreliosis. Med Microbiol Immunol 2014 ; 203 : 125–32.
Stanek G, Wormser GP, Gray J, et al. Lyme borreliosis : clinical case definitions for diagnosis and managment in Europe. Clin Microbiol Infect 2011 ; 17 : 69–79.
Vandenesch A, Turbelin C, Couturier E, et al. Incidence and hospitalisation rates of Lyme borreliosis, France, 2004 to 2012. Euro Surveill 2014 ; 19(34).
Wang G, Liveris D, Mukherjee P, et al. Molecular typing of Borrelia burgdorferi. Curr Protoc Microbiol 2014 ; 34 : 12C.5.1 12C.5.31.
Wagemakers A, Staarink PJ, Sprong H, et al. Borrelia miyamotoi : a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. Trends Parasitol 2015 ; 31(6) : 260–9.
Euro Surveill 2015 July 2015 ; 20(30).

33.3 Genre *Leptospira*

B. Jaulhac, S. de Martino, C. Le Brun

Généralités

Le genre *Leptospira* appartient à la famille des *Leptospiraceae* qui comprend les genres *Leptospira* et *Leptonema*. Seul ce premier est pathogène pour l'homme.

Les *Leptospira* étaient historiquement classés selon leurs déterminants antigéniques et deux espèces sont ainsi classiquement reconnues : *L. interrogans*, comprenant les souches pathogènes pour l'homme, et *L. biflexa*, regroupant les souches saprophytes. Ces deux espèces sont subdivisées en sérovars selon la réaction de Martin et Pettit, rassemblés en sérogroupes. On compte ainsi actuellement près de 300 sérovars repartis en 25 sérogroupes. Ces sérogroupes n'ont pas de base taxonomique, mais constituent une base épidémiologique pratique (Tableau 33.5).

Plus récemment, une classification moléculaire comprenant actuellement 21 espèces dénommées a été établie par hybridation ADN/ADN et séquençage. Parmi celles-ci, 9 sont reconnues pathogènes pour l'homme dans le monde, dont *L. interrogans*.

Cette classification est relativement indépendante de la classification sérologique, à laquelle on se réfère le plus souvent en clinique et en épidémiologie.

Épidémiologie et pouvoir pathogène naturel

La leptospirose a une distribution mondiale. Elle est présente dans les pays industrialisés comme dans les pays en voie de développement, mais son incidence est plus élevée dans les régions tropicales que dans les régions tempérées. En France métropolitaine, l'incidence moyenne est de 0,5 pour 100 000 habitants, Dans les DOM-TOM, l'incidence varie de 3 à 70 cas pour 100 000 habitants, avec un maximum en Guadeloupe et en Nouvelle-Calédonie. C'est ainsi que la France reste le pays européen avec l'incidence la plus forte.

La contamination humaine survient à la suite d'un contact direct ou indirect avec des urines d'animaux infectés. *Leptospira* survit facilement dans un milieu extérieur hydrique si celui-ci est à pH alcalin. Le réservoir est essentiellement animal : rongeurs (rats ++), animaux d'élevage (bovins essentiellement), mais aussi animaux domestiques.

La leptospirose perdure par suite de la colonisation persistante et asymptomatique de ces spirochètes dans le tubule proximal rénal, notamment dans celui des petits rongeurs.

La leptospirose est décrite dans certaines professions exposées aux morsures de rats mais, dans les pays industrialisés comme la France, l'homme se contamine le plus souvent par l'intermédiaire de milieux hydriques (étangs, rivières) lors d'activités de loisirs (baignade, pêche, voile).

Les leptospires pénètrent alors dans l'organisme par l'intermédiaire d'une érosion cutanée ou par les muqueuses, même intactes. Puis les spirochètes vont disséminer dans tous les organes et l'expression clinique est très variable,

Tableau 33.5 **Ancienne et nouvelle taxonomie des principales espèces de *Leptospira*.**

Espèce	Pathogénicité	Sérovar	Sérogroupe
L. interrogans	+	*australis* *bratislava* *bataviae* *canicola* *hebdomadis* *icterohemorragiae* *copenhageni* *lai* *pomona* *pyrogenes* *hardjo*	Australis Australis Bataviae Canicola Hebdomadis Icterohemorragiae Icterohemorragiae Icterohemorragiae Pomona Pyrogenes Hardjo
L. alexanderi	+	*Manhao3*	Manhao
L. fainei	+	*hurstbridge*	Hurstbridge
L. inadai	+	*lyme*	Lyme
L. kirschneri	+	*bim* *cynopteri* *grippotyphosa* *mozdok* *panama*	Autumnalis Cynopteri Grippotyphosa Pomona Panama

(*Suite*)

Tableau 33.5 **Suite.**

Espèce	Pathogénicité	Sérovar	Sérogroupe
L. meyeri	+	*semaranga*	Semaranga
L. borgpetersenii	+	*ballum* *castellonis* *javanica* *sejroe* *tarassovi*	Ballum Ballum Javanica Sejroe Tarassovi
L. weillii	+	*celledoni*	Celledoni
L. noguchii	+	*fortbragg*	Autumnalis
L. santarosai	+	*brasiliensis* *georgia*	Bataviae Mini
L. biflexa	–	*patoc*	Semaranga
L. alstoni	–		
L. broomii	–		
L. wolbachii	–	*codice*	
L. wolfii	–		

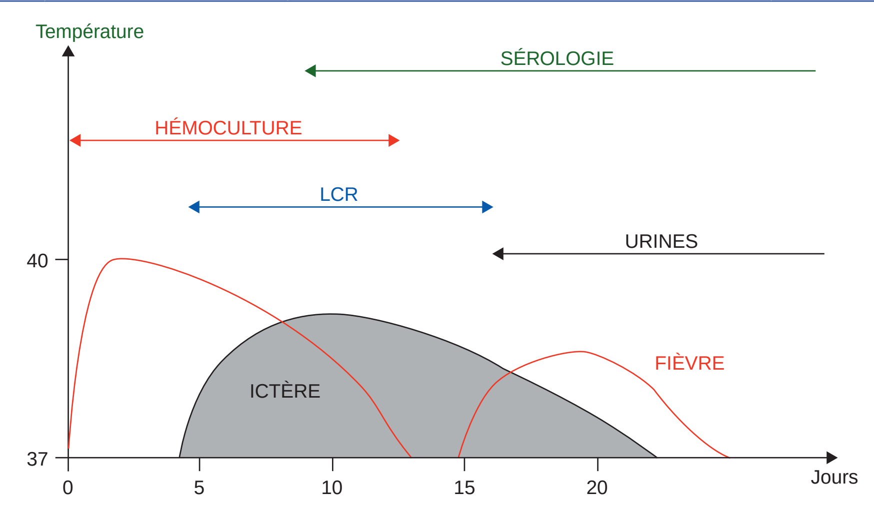


Fig. 33.4 Évolution de la leptospirose et prélèvements à réaliser.

allant de la forme fébrile pure modérée à l'atteinte multiviscérale hémorragique.

Dans la forme clinique « complète », le patient va typiquement présenter, 1 à 2 semaines après la contamination, un syndrome fébrile, un syndrome algique, une atteinte cutanéomuqueuse et un syndrome méningé. Cette phase fébrile est suivie d'une amélioration clinique. Une rechute fébrile est possible au 15e jour qui peut être associée à des altérations hépatiques (cytolyse + cholestase), rénales (dans 15 à 40 %), neurologiques (présence d'une méningite lymphocytaire dans 25 % des cas), hémorragiques, pulmonaires, cardiaques et oculaires (Fig. 33.4). La mortalité varie de 5 à 15 %.

Il n'y a pas de syndrome clinique plus spécifique d'un sérovar ou d'un autre.

Caractères bactériologiques

Les *Leptospira* sont des spirochètes aux extrémités en crochet possédant un seul flagelle périplasmique à chaque pôle sans chevauchement au centre par différence avec *Treponema* et *Borrelia*. Les dimensions des *Leptospira* sont de 6 à 20 μm de long et 0,1 μm de large. Leur structure, et notamment celle de leur paroi, est semblable à celle des autres spirochètes. En revanche, *Leptospira* ne possède qu'un seul flagelle périplasmique à chaque pôle sans chevauchement au centre par différence avec *Treponema* et *Borrelia*. Comme *Borrelia*, leur mobilité est fonction des conditions de culture. Les *Leptospira* sont chimio-organotrophes et leur métabolisme est aérobie. Par différence avec les *Borrelia*, ils possèdent une catalase et leur croissance ne nécessite pas la présence d'hydrate de carbone ni d'acides aminés dans le milieu de culture.

Leur GC % varie de 35 à 41 %. Les *Leptospira* possèdent deux chromosomes circulaires et leur séquence a été récemment établie.

Diagnostic bactériologique

Aspects préanalytiques

Les prélèvements doivent être faits avant toute antibiothérapie, notamment ceux destinés à la mise en culture.

Le sang pour hémoculture ne doit pas être prélevé sur flacons d'hémoculture car ceux-ci ne permettent pas la croissance de *Leptospira*. On prélèvera ≥ 1 ml de sang sur héparine ou EDTA (proscrire le citrate de sodium qui lyse les leptospires) dans les dix premiers jours suivant l'apparition de la fièvre. La recherche dans le LCR nécessite un volume ≥ 0,5 ml de LCR qui sera prélevé durant la deuxième semaine de la maladie.

La recherche de leptospires dans les urines ne s'effectue qu'entre le 7e et le 25e jour. La recherche par culture est délaissée au profit de la PCR, plus rapide, plus sensible et évitant l'inoculation à l'animal. Cette bactérie étant de plus peu tolérante au pH acide habituel de l'urine, il est nécessaire pour toute recherche d'alcaliniser les urines du patient immédiatement après le recueil. Dans tous les cas, les échantillons seront acheminés dans l'heure suivant le prélèvement à température ambiante. Une concentration des urines permet d'augmenter la sensibilité.

La recherche de leptospires dans les eaux suspectes nécessite le recueil d'un litre d'eau.

La sérologie nécessite deux prélèvements, le premier réalisé à partir du 8e jour de la maladie (début de la fièvre), le deuxième effectué 10 jours plus tard. Une antibiothérapie précoce est susceptible de faire avorter la réponse immunitaire spécifique.

Le risque de contamination du personnel de laboratoire est prévenu par le port de gants, et la manipulation des cultures et des animaux infectés sous poste de sécurité microbiologique.

Diagnostic direct

Examen direct

Au microscope à fond noir, au grossissement ×400 ou plus, les leptospires apparaissent comme de longs bacilles ondulés et mobiles dont les tours de spire sont peu visibles. Cette recherche n'étant ni sensible ni spécifique, la recherche par microscopie à fond noir sur le sang, le LCR ou les urines n'est pas recommandée.

Culture

La culture est réalisée en ensemençant les échantillons sur milieu liquide d'Ellinghausen-MacCullough modifié par Johnson et Harris (EMJH, Difco) ou milieu Tween-albumine. Ce milieu peut être rendu sélectif par ajout de 5-fluoro-uracile ou de fosfomycine, néomycine, kanamycine, rifampicine.

On ensemence un maximum de 10 % du volume final du milieu de culture avec l'échantillon à tester. Il est fortement conseillé de filtrer les urines au préalable sur un filtre de porosité 0,45 mm, puis sur un filtre de 0,22 µm. Les cultures sont classiquement incubées à 28 à 30 °C à l'obscurité pendant 8 semaines. Elles sont systématiquement contrôlées au microscope à fond noir toutes les semaines car une culture positive ne trouble pas le milieu de culture, et elles sont repiquées systématiquement à J + 15 en cas de négativité de la culture primaire.

Les cultures positives sont identifiées par le Centre national de référence (CNR) des leptospires à l'Institut Pasteur de Paris. L'identification est réalisée par le CNR par des méthodes moléculaires et la détermination du sérogroupe se fait par micro-agglutination à l'aide d'un panel de sérums des différents sérogroupes. La détermination du sérovar s'effectue par des tests d'agglutination et d'absorption croisée.

Inoculation à l'animal

Cette inoculation est effectuée par inoculation intrapéritonéale de 1 ml de l'échantillon à de jeunes cobayes ou à des hamsters qui peuvent être immunodéprimés pour augmenter la sensibilité de la méthode. Les animaux sont surveillés quotidiennement à la recherche de l'apparition d'une fièvre ≥ 41 °C. Ils sont alors sacrifiés, et le sang, le foie et les reins des animaux inoculés sont broyés en conditions de sécurité puis inoculés en milieu EMJH. Cette inoculation est réservée à des laboratoires spécialisés disposant d'une animalerie remplissant toutes les conditions de sécurité.

Techniques moléculaires

Ces méthodes sont plus rapides et plus sensibles que l'isolement par culture et ne sont pas sujettes aux problèmes de contamination des échantillons. Elles sont de plus applicables aux échantillons de nature variée (sang, LCR, urine, humeur aqueuse) prélevés aux différents temps de la maladie. Il n'y a pas de consensus sur le gène cible à utiliser pour l'amplification. Certains auteurs utilisent les gènes d'ADNr, d'autres une séquence d'insertion.

Cet acte est inscrit à la nomenclature des actes de biologie médicale depuis 2014. La recherche par PCR doit remplacer la sérologie : sur le sang dans les 10 premiers jours des signes cliniques, dans le LCR entre le 5e et le 15e jour, dans les urines entre le 15e et le 25e jour. Dans tous les cas, le prélèvement doit être effectué avant toute antibiothérapie.

Le développement récent de différents protocoles par PCR en temps réel va permettre une diffusion large de ces outils diagnostiques.

Diagnostic sérologique

Le sérodiagnostic demeure actuellement la méthode la plus utilisée pour établir le diagnostic de leptospirose. Il existe actuellement deux méthodes : ELISA pour la recherche d'IgM, test d'agglutination microscopique (*microscopic agglutination test* [MAT]).

Test ELISA – IgM

Principe

Ces tests permettent la recherche d'IgM spécifiques, intéressante pour le diagnostic à un stade précoce de la maladie ainsi que pour le suivi évolutif.

Cinétique

L'ELISA IgM est un des tests sérologiques de dépistage le plus précocement positif, soit 7 à 8 jours après le début de la maladie. Il se négative environ 2 à 3 mois après la maladie.

Avantages et inconvénients

Ce sont des méthodes sensibles et spécifiques. Néanmoins, certains sérogroupes de *Leptospira* (Grippotyphosa, fréquent en France, Australis) peuvent donner des faux négatifs.

Test d'agglutination microscopique ou MAT

Ce test est l'ancienne réaction d'agglutination-lyse de Martin et Pettit mise au point en 1918. C'est la technique de référence mais elle n'est plus inscrite à la nomenclature des actes de biologie médicale.

Principe

Le test consiste à évaluer au microscope à fond noir le pourcentage d'agglutination de suspensions de souches représentatives des différents sérogroupes de *Leptospira* en présence de dilutions du sérum du patient. Le seuil de positivité en France métropolitaine est fixé à 1/100e. On considère qu'il y a séroconversion si le taux est multiplié par quatre entre deux prélèvements.

Cinétique des anticorps

Le MAT se positive 10 à 12 jours après le début de la maladie, soit en général 2 jours après l'ELISA. Au début de la positivité, on observe une co-agglutination vis-à-vis des antigènes de plusieurs sérogroupes. On détecte majoritairement des IgM, puis des IgG. Cela nécessite l'analyse de deux sérums pour pouvoir préciser le sérogroupe causal. Le MAT reste positif à un taux faible pendant des années vis-à-vis du sérogroupe homologue à celui de la souche responsable de l'infection.

Avantages et inconvénients

Ce test présente une très bonne spécificité si on analyse deux sérums à 15 jours d'intervalle, mais c'est, dans l'évolution de la maladie, le dernier test à se positiver. Il peut être faussement négatif en cas d'antibiothérapie précoce.

C'est un test de réalisation lourde et complexe et d'interprétation délicate.

Traitement

Deux protocoles antibiotiques sont possibles. Le plus souvent, on utilise la pénicilline G par voie intraveineuse (6×10^{6}/j) ou de l'ampicilline ou de la ceftriaxone pendant une semaine pour les formes sévères. L'alternative est constituée par la doxycycline per os (100 mg × 2/j pendant 7 jours), plutôt indiquée pour les formes de gravité modérée.

En cas de contact accidentel, une prophylaxie peut être réalisée par une prise unique de 200 mg de doxycycline.

La vaccination humaine à l'aide d'un antigène du sérovar *Icterohaemorrhagiae* est proposée en France pour les professions exposées aux morsures de rats (égoutiers, éboueurs).

Pour en savoir plus

Baranton G, Postic D, Dauwalder O. Leptospira. In : Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2007. p. 1507–20.

Baranton G, Postic D. Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. Int J Infect Dis 2006 ; 10 : 162–70.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis : a zoonotic disease of global importance. The Lancet Infect. Dis. 2003 ; 3 : 757–71.

Bourhy P, Bremont S, Zinini F, et al. Comparison of real-time PCR assays for détection of pathogenic Leptospira spp. in blood and identification of variations in target sequences. J Clin Microbiol 2011 ; 2154–60.

Levett P. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2001 ; 14 : 296–326.

Levett P. Leptospira. In : Manual of clinical microbiology. 11th ed Washington DC : ASM Press ; 2015. p. 1028–36.

Picardeau M. Leptospira spp. In : REMIC. 5e éd Société française de microbiologie ; 2015.

Rapports d'activité, Centre national de référence des Leptospira. InVS.

33.4 Genre *Treponema*

B. Jaulhac, S. de Martino, C. Le Brun

Généralités

Les agents des tréponématoses humaines appartiennent au genre *Treponema* qui fait partie de l'ordre des *Spirochaetales* et de la famille des *Spirochaetaceae*. Ce genre comprend actuellement plus de 30 espèces reconnues.

Le genre *Treponema* comprend notamment les pathogènes suivants :

- *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* est l'agent de la syphilis vénérienne. Cette maladie est actuellement en recrudescence en France et dans la plupart des pays européens ;
- *Treponema pallidum* subsp. *pertenue* est l'agent du pian ou *yaws* (en anglais), infection cutanéomuqueuse à transmission directe, non vénérienne, fréquemment observée dans la zone intertropicale ;
- *Treponema pallidum* subsp. *endemicum* est l'agent de la syphilis non vénérienne encore appelée bejel. Il est rencontré en Afrique du Nord ;
- *Treponema carateum* est responsable de la caraté ou pinta, affection localisée en Amérique centrale et du Sud, strictement cutanée, à transmission directe, également non vénérienne.

Ces quatre espèces de tréponèmes sont pathogènes pour l'homme et non cultivables.

Il existe également des tréponèmes commensaux des muqueuses, cultivables sur milieu artificiel. Ces tréponèmes de la cavité orale sont en général non pathogènes. En association avec certaines bactéries anaérobies, ils interviendraient dans des gingivites et des parodonties.

Épidémiologie et pouvoir pathogène naturel

T. pallidum subsp. *pallidum* est responsable de la syphilis, connue depuis la fin du XVe siècle en Europe.

Avec l'arrivée de la pénicilline et l'instauration d'un dépistage systématique, le nombre de cas de syphilis a beaucoup diminué. Toutefois, on a observé une réémergence des cas au début des années 2000 aux États-Unis, en Europe de l'Est et en France, expliquée par le rôle du VIH, la toxicomanie, l'appauvrissement des populations et le changement des mœurs sexuelles. Cette augmentation était corrélée à une augmentation des gonococcies. Un réseau de surveillance de la syphilis en France a été créé en 2000 : le réseau RésIST coordonné par l'Institut national de veille sanitaire (InVS). Il récolte les données ethniques et cliniques auprès

de sites volontaires : les Centres d'information, de dépistage et de diagnostic des infections sexuellement transmissibles (CIDDIST), des consultations hospitalières et des médecins de ville. Le nombre de cas de syphilis déclarés a d'abord augmenté jusqu'en 2007 pour diminuer en 2008 et 2009, en Île-de-France et dans les autres régions.

Depuis 2009, le nombre de cas rapportés de syphilis récente augmente chez les hommes tandis que, chez les femmes, ce nombre est relativement stable. Les femmes ne représentent que 4 % des cas rapportés en 2013. Depuis 2010, le nombre de cas franciliens représente environ un quart des cas rapportés. Chez les hommes, les 20–49 ans sont les classes d'âge les plus touchées, alors que l'âge médian des femmes en 2013 était de 24 ans. Les courbes de vente de benzathine benzylpénicilline (Extencilline®), traitement de référence de la syphilis et indicateur indirect, montrent une légère augmentation ces cinq dernières années en Île-de-France et une relative stabilité dans les autres régions métropolitaines. Les hommes homo-bisexuels représentent plus de 80 % de l'ensemble des cas rapportés par le réseau RésIST. Un tiers des cas rapportés en 2013 ont des co-infections syphilis récente et VIH : 32 % de sérologies VIH + connues et 3 % de découvertes à l'occasion de la syphilis.

C'est une affection strictement humaine à transmission vénérienne qui évolue en plusieurs phases.

La transmission se fait presque toujours par contact direct vénérien, la vitalité des tréponèmes est faible en dehors de l'organisme humain.

La classification européenne (European Centre for Disease Prevention and Control) repose sur deux stades ayant des traitements différents : la syphilis précoce de moins d'un an d'évolution et la syphilis tardive de plus d'un an d'évolution ou que l'on ne peut pas dater.

Syphilis précoce

Après une incubation silencieuse de 10 à 90 jours (habituellement 14 à 21 jours), la **phase primaire** est caractérisée par le chancre d'inoculation : il s'agit d'une ulcération indolore à base indurée, siégeant au point d'inoculation (génital, anal, buccal ou cutané) et accompagnée d'une adénopathie satellite. Non traité, le chancre « guérit » spontanément en 4 à 6 semaines.

La **phase secondaire** correspond à la phase de dissémination des bactéries. Elle débute 2 mois environ après le contage et se caractérise par des lésions cutanéomuqueuses très contagieuses qui peuvent être polymorphes (roséole, syphilides, plaques muqueuses, condylomes, alopécie, atteinte des ongles, etc.) et qui vont souvent s'accompagner de micropolyadénopathies et d'un syndrome infectieux. Ces signes disparaissent spontanément en 1 à 2 ans. Ces manifestations se retrouvent chez un tiers des patients non traités précocement.

La **syphilis latente précoce** se définit comme la syphilis asymptomatique de moins d'un an d'évolution diagnostiquée par des tests sérologiques (séroconversion documentée ou augmentation significative du titre du test non tréponémique) avec la notion sans équivoque d'une syphilis clinique primaire ou secondaire ou un partenaire ayant une syphilis précoce documentée dans l'année.

Syphilis tardive

La **syphilis latente tardive** correspond à phase silencieuse pendant laquelle la syphilis est cliniquement asymptomatique et non contagieuse et qui est dépistée par la sérologie.

La **syphilis tertiaire** survient après des années d'évolution dans 10 à 30 % des cas non traités. Elle est caractérisée par des atteintes viscérales, cardiovasculaires (aortite, anévrisme de l'aorte) ou neurologiques (paralysie générale), associées à des lésions osseuses ou cutanéomuqueuses.

Les malades sont contagieux pendant les phases primaire et secondaire où les tréponèmes sont très nombreux dans les lésions cutanées et muqueuses.

Autres formes de syphilis

La syphilis peut être transmise au fœtus par sa mère, lorsque celle-ci est atteinte de syphilis évolutive. Le risque pour le fœtus est très faible durant le 1er trimestre de grossesse, mais élevé à partir du 4e mois. Le passage transplacentaire de *T. pallidum* entraîne alors une atteinte systémique du fœtus, responsable de la mort fœtale, ou d'une forme néonatale précoce de mauvais pronostic. L'atteinte est d'autant plus sévère que la contamination est plus précoce. Un nouveau-né contaminé au cours de l'accouchement développe une forme congénitale ; elle peut être asymptomatique ou comporter des lésions cutanéomuqueuses, une atteinte osseuse et des troubles hématologiques.

La contamination est possible par l'intermédiaire de produits sanguins, d'où la réalisation d'un contrôle systématique des donneurs de sang. Dans les pays effectuant ce contrôle, ce mode de transmission reste possible chez les toxicomanes intraveineux.

Dans les tréponématoses endémiques (pian, pinta, bejel), la contamination n'est pas vénérienne et a le plus souvent lieu dans l'enfance par contact avec des lésions contagieuses. La clinique du pian est superposable à celle de la syphilis. Il évolue en trois phases mais ne se complique pas de localisations viscérales tardives. La syphilis endémique ou bejel s'observe aux Antilles, au Moyen-Orient (zones sèches) et dans les régions désertiques d'Afrique. Le pian se retrouve dans les régions intertropicales mais humides, et la pinta ou caraté en Amérique centrale et Amérique du Sud.

Aucune technique de diagnostic direct ou indirect ne permet de distinguer ces agents pathogènes de tréponématoses non vénériennes de *T. pallidum* subsp. *pallidum*.

Caractères bactériologiques

T. pallidum est une bactérie mobile, de forme hélicoïdale, mesurant 8 à 15 µm de long sur 0,3 µm de large. Elle a été mise en évidence au microscope à fond noir pour la première fois par Shaudinn et Hoffmann. Sa structure est commune à celles des autres spirochètes.

La couche de peptidoglycane est très mince et *T. pallidum* est une bactérie très fragile, rapidement tuée par la chaleur, le froid et la dessiccation. Ce spirochète ne survit pas dans le milieu extérieur et est strictement adapté à l'homme.

T. pallidum n'a actuellement jamais pu être cultivé in vitro. Seules des souches d'autres espèces de tréponèmes, non pathogènes, ont pu être cultivées, notamment *T. phagedenis*,

souche Reiter, qui possède des antigènes communs à *T. pallidum* et qui, de ce fait, a été utilisé à des fins diagnostiques.

La culture de *T. pallidum* est possible in vivo par injection intratesticulaire de *T. pallidum* à un lapin, ce qui provoque en 9 à 11 jours une orchite riche en tréponèmes. La souche Nichols est ainsi régulièrement entretenue sur testicule de lapin et est utilisée pour réaliser une suspension antigénique pour lames d'immunofluorescence indirecte (et le test diagnostique de Nelson qui a été abandonné).

Les antigènes de *T. pallidum* sont nombreux : peptides, glycoprotéines et polysaccharides de l'enveloppe externe sont antigéniques ainsi que les protéines des flagelles. Le cardiolipide qui suscite la formation d'anticorps fixant le complément (réagine syphilitique) est un constituant non spécifique de la membrane cytoplasmique.

Diagnostic direct

Aspects préanalytiques

Les prélèvements doivent être faits avant toute antibiothérapie.

T. pallidum peut être mis en évidence dans les lésions primaires et secondaires de la maladie. Le prélèvement doit ramener une sérosité exempte de sang qui permettra un examen microscopique direct à l'état frais ou après fixation et coloration. Un résultat positif fait suspecter la syphilis ; un résultat négatif ne l'élimine pas.

Les prélèvements à effectuer sont les suivants.

- Chancre et lésions cutanées : le prélèvement doit de préférence être réalisé au laboratoire (à défaut, acheminer au maximum dans les 30 minutes qui suivent) et être examiné immédiatement. Après nettoyage au sérum physiologique, on prélève les sérosités présentes au fond du chancre ou des lésions.
- Neurosyphilis : la recherche dans le LCR nécessite un volume ≥ 0,5 ml de LCR. Le LCR est acheminé tel quel au laboratoire, à +4 °C, en moins de 24 heures, ou transporté congelé puis conservé à –80 °C si le délai est plus long (l'examen au microscope à fond noir est alors sans valeur). Le LCR est surtout utilisé pour mettre en évidence une pléiocytose, une hyperprotéinorachie, la présence d'anticorps anti-*Treponema* ou une PCR spécifique.
- Syphilis congénitale : la recherche se fait à partir du sang de cordon, du placenta, des sécrétions nasales ou buccales et de la peau.

À noter que, devant toute ulcération, le prélèvement doit se pratiquer avec des gants pour éviter le risque de contamination.

État frais

Au microscope à fond noir, les tréponèmes apparaissent comme des spirales ondulées et mobiles.

On ne peut distinguer *T. pallidum* des tréponèmes saprophytes (surtout *T. denticola* et *refringens*), d'où un risque de faux positif pour certaines localisations de lésions (bouche, anus). Ces localisations ne doivent donc pas faire l'objet d'une analyse en fond noir.

La sensibilité de cet examen est variable en fonction de l'entraînement de l'observateur. Elle a été évaluée jusqu'à 97 % sur des prélèvements de lésions génitales dans des syphilis primaires et secondaires. Néanmoins, cet examen peut s'avérer négatif s'il y a peu de tréponèmes dans le prélèvement (surtout dans les lésions cutanées), après traitement local ou général, ou à cause d'un problème technique (présence de sang, mauvais réglage du microscope, etc.). Cet examen est difficilement réalisable en dehors des services spécialisés et entraînés.

Coloration

La méthode de Gram n'est pas utilisable. Les meilleurs résultats sont obtenus par l'imprégnation argentique de Fontana-Tribondeau, de réalisation délicate.

Immunofluorescence directe

Les frottis sont recouverts d'une dilution d'anticorps monoclonaux anti-*T. pallidum* marqués par un fluorochrome ou par des anticorps polyclonaux non marqués révélés dans un second temps par une antiglobuline spécifique d'espèce marquée à la fluorescéine. Après lavages, les frottis sont observés en microscopie à éclairage ultraviolet.

Les avantages de la fluorescence sont une meilleure spécificité et une meilleure sensibilité. En effet, elle permet normalement de distinguer *T. pallidum* des tréponèmes saprophytes.

Test d'infectivité sur lapin

Cette méthode n'est pas praticable en routine et nécessite un laboratoire spécialisé.

C'est la technique directe la plus sensible et le seul test valable pour démontrer la présence de tréponèmes virulents. Elle a une sensibilité proche de 100 % chez un malade n'ayant pas reçu d'antibiotiques.

Méthodes moléculaires

Différentes cibles ont été proposées pour détecter la présence d'ADN de *T. pallidum* par PCR directement dans les échantillons biologiques et notamment les gènes des protéines de membrane externe.

La PCR ne permet pas de différencier *T. pallidum* de *T. pertenue*.

Le statut VIH ne modifie pas la validité de la PCR.

La PCR a une bonne sensibilité sur les lésions de syphilis primaire, mais montre une sensibilité modérée dans le sang lors des syphilis primaire et secondaire. Dans la syphilis primaire, une sensibilité de 94,7 % et une spécificité de 98,6 % sont rapportées pour la détection de *T. pallidum* dans les lésions génitales. La PCR a permis de mettre en évidence une bactériémie chez environ 30 % des patients en phase secondaire.

Dans le liquide amniotique et l'humeur vitrée, la PCR se révèle un outil sensible et spécifique, et donc une aide au diagnostic dans des situations où l'interprétation des sérologies est souvent délicate.

Dans le LCR, les résultats sont variables selon la littérature. La recherche d'inhibiteurs doit être systématique pour éviter les faux négatifs.

Actuellement, plusieurs kits commerciaux existent permettant la détection simultanée d'autres pathogènes responsables d'ulcérations : *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus ducreyi*, HSV.

Cette méthode n'est actuellement pas inscrite à la nomenclature des actes de biologie médicale.

Diagnostic indirect ou sérologique

La recherche des anticorps antisyphilitiques est, depuis la fin du XIX[e] siècle, la méthode la plus utilisée pour le diagnostic biologique de la syphilis.

Même avec les méthodes actuelles très sensibles, il persiste, en début d'infection, une phase où la sérologie est négative. L'apparition des anticorps, ou séroconversion, survient 30 à 40 jours après la contamination. En cas de contage récent, il est donc nécessaire de contrôler tout résultat négatif.

Les différents tests disponibles sont résumés dans le tableau 33.6.

Les causes de fausses sérologies positives de la syphilis sont présentées dans le tableau 33.7. Voir aussi les encadrés 33.2 et 33.3.

Tests à antigène non tréponémique (TNT) : VDRL (*veneral disease reagent laboratory*), RPR (*rapid plasma reagin*)

L'antigène utilisé est le cardiolipide, haptène lipidique présent chez *T. pallidum*, chez d'autres tréponèmes et d'autres bactéries, mais également dans des cellules végétales ou animales. Il a été utilisé historiquement pour la première fois pour le diagnostic de la syphilis par Wassermann qui a appliqué la réaction de fixation du complément de Bordet, d'où la dénomination de réaction de Bordet-Wassermann ou BW, dénomination encore utilisée improprement par certains prescripteurs, la réaction de fixation du complément n'étant plus utilisée pour cette sérologie.

Principe du VDRL

C'est une réaction d'agglutination passive entre le sérum non dilué et le réactif antigénique sur lame. L'intensité des agglutinats est notée de 1 à 4 croix.

En cas de dépistage positif, une quantification est effectuée par des dilutions de raison 2 du sérum. Le titre est donné par l'inverse de la dernière dilution présentant une réactivité à 2 croix.

Cinétique

Habituellement, le VDRL se positive 10 à 20 jours après l'apparition du chancre. Le taux des anticorps augmente rapidement au cours de la syphilis secondaire.

C'est la première technique à se négativer après traitement. En l'absence de traitement, le taux peut rester en plateau à des valeurs variables d'un sujet à l'autre.

Avantages et inconvénients

C'est une réaction simple, rapide et peu onéreuse. Ce test, quantitatif, constitue une bonne technique de dépistage, de suivi des syphilis symptomatiques, un bon marqueur de suivi de l'efficacité thérapeutique et de surveillance de l'apparition de recontaminations.

Le VDRL peut être faussement négatif par l'existence d'un phénomène de zone, d'où la nécessité de toujours tester au moins 3 dilutions de chaque sérum. Cela se voit surtout dans les sérums des femmes enceintes, des sujets co-infectés par le VIH et dans le LCR.

Le principal problème est son manque de spécificité. Les causes de faux positif sont nombreuses : infections bactériennes, virales et parasitaires (Tableau 33.7) et certains états physiologiques ou pathologiques (grossesse, maladies auto-immunes, toxicomanie, dysprotéinémies, etc.).

Tests à antigène tréponémique (TT)

TPHA (*Treponema pallidum haemagglutination assay*) ou TPPA (*Treponema pallidum particle agglutination assay*)

Principe

C'est une réaction d'hémagglutination passive qui met en contact le sérum du patient avec des hématies (TPHA) ou des particules de gélatine (TPPA) sensibilisées avec un ultrasonicat de *T. pallidum*, après absorption des anticorps anti-antigène de genre *Treponema* et anti-hématies. Pour le dépistage, le sérum est testé au 1/80[e], 1/160[e] et 1/320[e]. En cas de positivité, des dilutions de raison géométrique 2 sont réalisées pour le titrage. Les titres obtenus peuvent parfois être très élevés.

Le TPHA est très spécifique s'il est bien réalisé (≥99 %) et très sensible, sauf peut-être au stade très précoce de la syphilis où il serait moins sensible que le FTA.

Cinétique

Le TPHA se positive entre la 3[e] et 4[e] semaine après la contamination, soit une semaine à 10 jours après l'apparition du chancre. Il se négative en cas de traitement précoce mais reste positif en cas de traitement tardif chez un malade guéri.

Avantages et inconvénients

La technique est peu onéreuse et s'applique à de grandes comme à de petites séries.

Il existe de fausses réactions négatives dans certaines syphilis très précoces ainsi qu'en présence d'un excès d'anticorps (phénomène de zone). Ce dernier risque est prévenu en testant systématiquement plusieurs dilutions du même sérum.

Le TPHA se positive plus tardivement que le FTA-Abs en début d'infection. Des études récentes rapportent que le TPPA serait plus sensible que le TPHA et le FTA-Abs pour le diagnostic des syphilis primaires.

D'exceptionnelles fausses positivités ont été ponctuellement rapportées dans certaines maladies auto-immunes, la lèpre, la grossesse ou chez des sujets avec des taux élevés d'IgM, A ou G non spécifiques.

FTA (*fluorescent treponemal antibody test*)

Principe

C'est une réaction d'immunofluorescence indirecte qui met en contact le sérum du patient au 1/200[e] sur une lame recouverte

Tableau 33.6 **Comparaison des différents outils de diagnostic sérologique de la syphilis.**

	Tests de dépistage				**Tests complémentaires**				**Nouveaux tests diagnostiques**	
	VDRL-RPR	**TPHA/TPPA**	**FTA-Abs**	**ELISA**	**IgM**			**Nelson (n'est plus pratiqué)**	**Tests « rapides »**	***Western-blot* ou *Dot-blot***
					FTA-IgM	**SPHA**	**ELISA**			
Nature de l'antigène	Suspension lipidique	Hématies sensibilisées avec lysat de *T. pallidum*	*T. pallidum* entiers fixés sur une lame	Lysat de *T. pallidum* ou protéines recombinantes	*T. pallidum* entiers fixés sur une lame	Hématies sensibilisées avec lysat *T. pallidum*	Lysat de *T. palli-dum* ou protéines recombi-nantes	*T. pallidum* vivants	Protéines recombinantes (P15, P17, TmpA, P47 kDa)	Lysat de *T. pallidum* ou protéines recombinantes
Intérêts	– Simple – Rapide – Peu coûteux – Suivi du traitement	– Spécifique – Simple – Peu coûteux – Adaptable à de grandes ou petites séries	– Spécifique – Sensible	– Simple – Spécifique – Sensible – Automatisable, applicable à de grandes séries	– Précoce – Sensible – –Spécifique – Marqueur syphilis active – Suivi thérapeutique – Syphilis congénitale			Spécificité 100 %	– Test unitaire au « coup par coup »	– Confirmation – Diagnostic syphilis congénitale (IgM spécifiques) – Marqueur d'évolutivité ?
Limites	– Faux positif : – infections bactériennes, virales, MAI, etc. – Faux négatifs (phénomène de zone)	– Peu influencé par traitement – Faux négatifs : phénomène de zone – Faux positifs : autres tréponématoses	– Lecture délicate – Peu influencé par traitement – Faux positifs : MAI, autres tréponéma-toses	– Tests qualitatifs – Coût – Peu influencé par traitement – Faux positifs : autres tréponématoses	– Lecture délicate – Faux positifs : MAI	– Réalisation et lecture opérateur-dépendants	– Coût	– Entretien souche vivante – Standardisation – Coût	– Tests qualitatifs – Stabilité à température ambiante – Performance – variable	– Coût – Faux positifs : autres trépo-nématoses

Tableau 33.7 Causes de sérologie syphilis faussement positive.

Faux VDRL positifs (fréquents)
Fausses réactions aiguës :
– Causes infectieuses
- *bactériennes :* lèpre, tuberculose, leptospirose, borréliose, etc.
- *virales* : varicelle, oreillons, mononucléose infectieuse, hépatite virale, rougeole, etc.
- *parasitaires* : paludisme, etc.

– Causes non infectieuses : grossesse, vaccinations, utilisation de drogues par voie intraveineuse, etc.
Fausses réactions positives chroniques
– Causes infectieuses : infections virales (VIH) ou parasitaires chroniques
– Causes non infectieuses :
- maladies auto-immunes : lupus, anémies auto-immunes
- gammapathie monoclonale
- hépatopathie chronique
- syndrome des antiphospholipides
- cancers, etc.

Faux TPHA positifs (très rare)
– Souvent transitoire et d'origine non identifiée
– Maladies auto-immunes, grossesse, âge, etc.
– Borréliose de Lyme.
Faux FTA positifs (rare)
– Facteurs rhumatoïdes, anticorps anti-ADN.
– Maladies auto-immunes, grossesse, infections virales ou bactériennes (autres spirochètes), etc.

Encadré 33.2 Dépistage de la syphilis en France

Actuellement en France, le dépistage de la syphilis comprend, selon la nomenclature des actes de biologie médicale (NABM), au moins une réaction de chacun des deux groupes suivants :

- groupe 1 : VDRL Latex, VDRL coloré ou VDRL charbon ;
- groupe 2 : FTA-Abs (immunofluorescence indirecte absorbée), TPHA (hémagglutination passive), EIA (méthode immuno-enzymatique).

Si un des deux tests est positif, un titrage doit être pratiqué sur les deux tests.

En mai 2015, la Haute autorité de santé (HAS) a donné un avis favorable à la proposition de l'Union nationale des caisses d'assurance maladie (UNCAM) et du Centre national de référence (CNR) de la syphilis de modifier la NABM. La proposition est de remplacer l'association systématique d'emblée d'un test tréponémique et d'un test non tréponémique par un seul test tréponémique des Ig totales, avec une méthode reproductible et automatisable de type immuno-enzymatique (technique d'ELISA ou apparentée), qui sera confirmé par un test non tréponémique quantitatif en cas de positivité du test tréponémique initial (voir Fig. 33.5).

de tréponèmes entiers tués, d'où la dénomination de FTA-200. Après lavage, les anticorps fixés sont révélés par une antiglobuline humaine marquée par un fluorochrome et la lame est lue en épifluorescence. La recherche des IgM est possible en utilisant comme révélateur un conjugué monospécifique anti-chaîne μ.

Encadré 33.3 Quelques points importants sur la syphilis

- Un VDRL isolé n'est pas synonyme de syphilis (grossesse, syndrome des anticardiolipides par exemple).
- Le sérodiagnostic de la syphilis ne se positive qu'au 5e–10e jour du chancre.
- TPHA et VDRL sont toujours fortement positifs au stade de syphilis secondaire.
- Le TPHA affirme ou infirme le diagnostic de tréponématose ; le VDRL en précise l'évolutivité.
- Toujours pratiquer les sérologies répétées dans le même laboratoire.
- Ne pas chercher à négativer un test tréponémique par des traitements répétés.
- Aucun test sérologique ne permet de faire la différence entre une syphilis et une tréponématose non vénérienne (pian, bejel ou pinta).
- La syphilis est sévère chez la femme enceinte. Son dépistage reste justifié.
- Devant un résultat positif, il est très utile de disposer d'une sérologie antérieure négative.
- La syphilis est une infection sexuellement transmise (IST), elle peut donc être associée à d'autres IST qu'il convient de rechercher.

Ce test donnant initialement de nombreuses fausses positivités, il a été modifié pour donner le FTA-Abs ou FTA absorbé, où le sérum du malade est préalablement absorbé par un ultrasonat de tréponèmes saprophytes (souche Reiter). Les résultats qualitatifs sont exprimés en croix selon l'intensité de la fluorescence. En cas de positivité, des dilutions de sérum de raison géométrique 2 sont effectuées et le titre est l'inverse de la dernière dilution donnant une réaction fluorescente à deux croix.

Cinétique des anticorps

Décelables peu après l'apparition du chancre, les anticorps existent à tous les stades de la maladie. Après traitement, ils se négativent lentement et disparaissent dans la majorité des cas.

Avantages et inconvénients

C'est un test sensible (86 à 96 % selon les stades) et spécifique (92 à 99 %) qui permet de confirmer un diagnostic mais aussi de suivre l'efficacité d'un traitement.

Il existe des faux positifs : maladies auto-immunes, autres spirochétoses (borréliose de Lyme, leptospirose, mais cela est rare) et, selon les auteurs, en cas d'herpès génital.

Il est important de prendre en compte dans le choix de cette technique que la lecture de ce test reste subjective et exige donc un personnel expérimenté.

Test immuno-enzymatique ou ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Principe

Les techniques immuno-enzymatiques indirectes ou compétitives utilisent des antigènes tréponémiques purifiés ou recombinants (souche Nichols). Elles détectent les IgM et

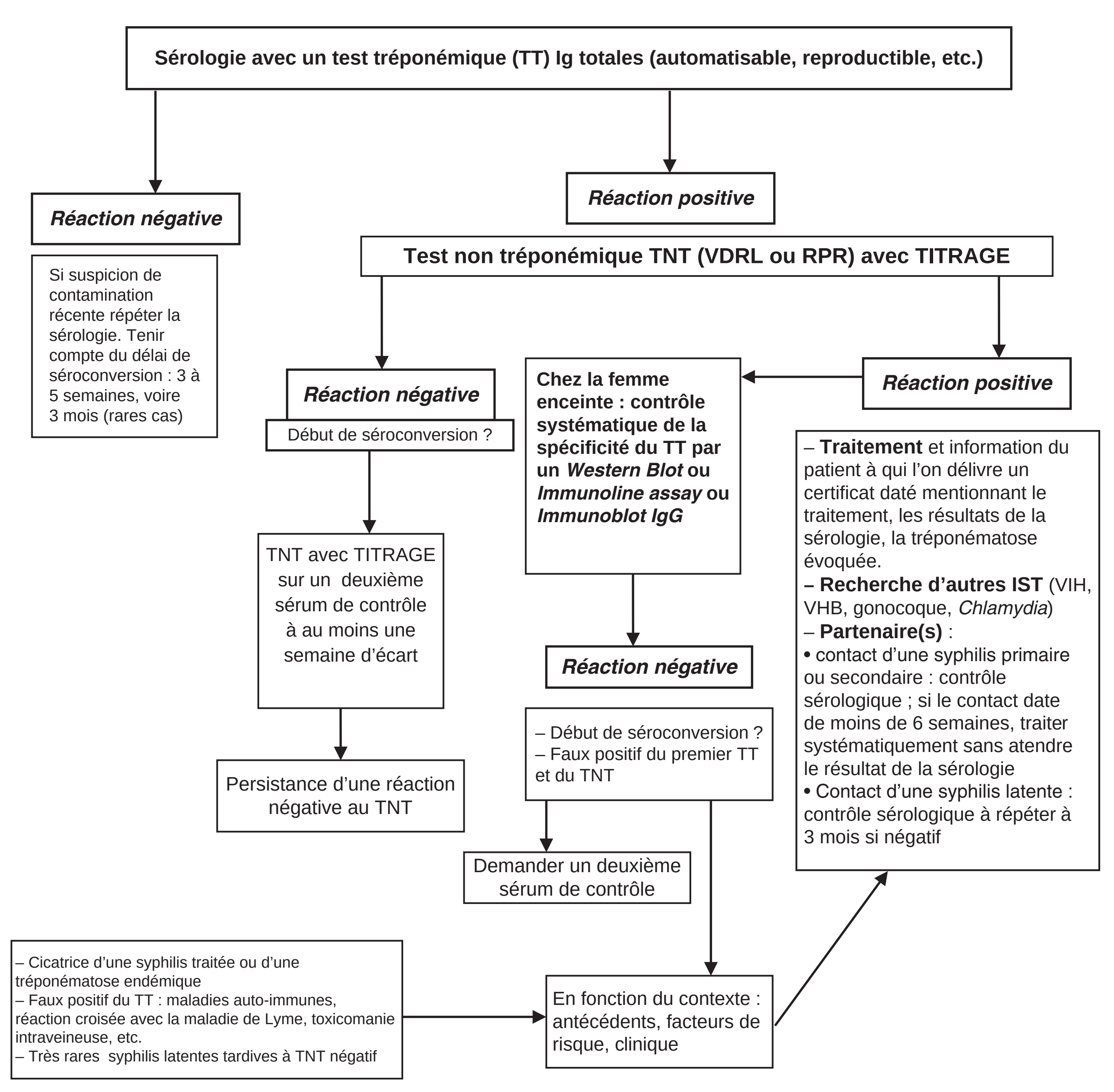


Fig. 33.5 Logigramme pour le dépistage des tréponématoses proposé par le CNR de la syphilis et approuvé par la HAS en mai 2015.

les IgG. Le nombre de coffrets commercialisés a nettement augmenté ces dernières années.

Les méthodes ELISA fondées sur une technique d'immuno-capture ou de compétition peuvent être plus sensibles que les méthodes sandwich. Les ELISA utilisant des antigènes recombinants ne donneraient pas de meilleures performances que les tests utilisant un sonicat *de T. pallidum* comme antigène.

Ces tests permettent aussi la recherche d'IgM spécifiques, intéressante pour le diagnostic à un stade très précoce de la syphilis ainsi que pour le suivi évolutif.

Cinétique

L'ELISA est l'un des tests de dépistage le plus précocement positif. Les IgM apparaîtraient dès la deuxième semaine de l'infection, suivies rapidement des IgG.

Avantages et inconvénients

Ce sont des méthodes simples, sensibles, rapides qui sont automatisables, donc applicables à de grandes séries, objectives et observateur-indépendant. Elles ne présentent jamais de phénomène de zone. On peut en outre détecter les Ig totales ou les IgG et les IgM séparément. La sensibilité de certains tests ELISA serait supérieure à celle du TPHA. L'ELISA constitue donc une méthode alternative intéressante aux techniques de dépistage.

Néanmoins, les tests sont actuellement uniquement qualitatifs, ce qui ne dispense pas de réaliser les autres tests si le résultat est positif.

L'indication majeure de la recherche des IgM est la syphilis congénitale, mais elle peut être utile en cas de contage récent, de ré-infection ou de syphilis neurologique.

Test d'immuno-empreinte (*Western-blot*)

Principe

Des protéines spécifiques de *T. pallidum* sont immobilisées sur une membrane que l'on met en contact avec le sérum du patient. Il existe plus de 22 antigènes tréponémiques polypeptidiques qui réagissent avec le sérum de patients syphilitiques. De nombreux travaux montrent que les bandes les plus importantes pour diagnostiquer une syphilis sont celles de 15,5, 17, 44,5 (TmpA) et 47 kDa.

Cinétique

Le *Western-blot* serait positif lors de la primo-infection avant le TPHA. La cinétique d'apparition des bandes en fonction de l'évolution de la maladie est encore peu documentée. Les études sont contradictoires, mais il semble que :

- les protéines de 17 kDa et TmpA (44,5 kDa) soient mises en évidence dès le stade primaire ;
- la protéine de 15,5 kDa soit détectée aux stades précoce et tardif ;
- la protéine de 47 kDa soit moins spécifique.

Avantages et inconvénients

Il existe des réactifs commercialisés prêts à l'emploi qui permettent de détecter les IgG et les IgM en 3 heures. La technique est de réalisation facile, sensible et très spécifique.

La méthode est plus sensible que le TPHA. On ne retrouve pas d'interférences avec les anticorps anticardiolipidiques, les facteurs rhumatoïdes ou lors de la grossesse. Des réactions croisées seraient possibles avec les autres spirochétoses. Le *Western-blot* IgG est considéré comme une méthode de confirmation d'une sérologie de dépistage positive ou douteuse qui doit remplacer le test de Nelson.

À noter que le *Western-blot* ne permet pas de différencier une cicatrice sérologique d'une syphilis latente, ni de distinguer la syphilis des autres tréponématoses endémiques.

Tests rapides

Tests immunochromatographiques

La méthode permet de tester les échantillons au coup par coup. Deux antigènes recombinants spécifiques de *T. pallidum* (protéines 17 kDa et 47 kDa) liés à des particules d'or colloïdal sont immobilisés sur une membrane. La bandelette est immergée dans le sérum à tester et, après migration par chromatographie, une bande colorée apparaît au niveau de la zone où sont immobilisés les antigènes en cas de positivité.

C'est un test simple, rapide, qualitatif, de dépistage qui doit être confirmé en cas de positivité par un dosage quantitatif des anticorps (TPHA, FTA). Les tests ont des performances variables selon les coffrets. Ils peuvent être moins sensibles que les tests classiques. Ils sont très utilisés dans les pays en voie de développement.

PaGIA (*particle gel immunoassay*)

Cette technique met en jeu des billes sensibilisées avec des antigènes recombinants TpN15, TpN17, TpN47. Après centrifugation des tubes contenant la matrice de gel, la réaction finale se traduit sous la forme d'une agglutination en présence d'un sérum positif. Cette technique offre une excellente spécificité et une sensibilité comparable à celle des autres tests tréponémiques. Elle a l'avantage d'être simple et ne demande que 20 minutes.

Agglutination

C'est une technique d'agglutination de particules de latex dans laquelle les antigènes recombinants de *T. pallidum* sont liés à des particules de latex.

La sensibilité des tests rapides qui peuvent être réalisés directement au bout du doigt sur sang total est variable selon les études. Les avantages sont leur coût faible, la rapidité des résultats ainsi que leur faisabilité sans matériel ni formation, ce qui est pratique dans les centres de dépistage. Cependant, une confirmation par un autre test avec titrage est nécessaire pour dater l'infection et suivre l'efficacité du traitement.

Recherche d'IgM spécifiques antitréponémiques

Cinétique des IgM

Les IgM sont les premiers anticorps à apparaître, dès la deuxième semaine de l'infection, suivies rapidement des IgG.

Chez les patients non traités, on peut aussi mettre en évidence des IgM au cours de la phase secondaire. Chez les patients traités correctement, les IgM diminuent rapidement et disparaissent en quelques mois. La présence d'IgM signe une syphilis active.

Intérêts de la recherche d'IgM

La principale indication est la syphilis congénitale. Chez le nouveau-né, des IgM positives affirment une syphilis congénitale avant l'apparition des IgG de l'enfant.

La recherche d'IgM est aussi intéressante en cas de réinfection, de neurosyphilis ou devant la notion de contage récent avec IgG négatives.

Chez le patient traité, la persistance d'IgM fait craindre un échec thérapeutique ou une recontamination et indique la nécessité d'un nouveau traitement.

Méthodes de recherche des IgM spécifiques

FTA-Abs IgM

Les IgM sont recherchées par une réaction d'immunofluorescence indirecte absorbée avec comme révélateur un conjugué monospécifique antichaîne μ.

Ce test présente les mêmes inconvénients que le FTA-Abs. Il existe de fausses réactions positives dues au facteur rhumatoïde et aux anticorps antinucléaires. Des faux négatifs dus à l'inhibition compétitive par les IgG sont possibles dans les syphilis secondaires. La lecture de la fluorescence est délicate.

19S FTA Abs-IgM

Le principe est le même que le FTA-Abs IgM, mais le sérum est initialement fractionné par ultracentrifugation pour retenir les anticorps de classe M, ce qui permet d'obtenir une meilleure spécificité. Cependant, la réalisation technique est lourde et la quantité de sérum nécessaire importante.

SPHA (*solid phase hemadsorption assay*) ou IgM-SPHA

La recherche des IgM est réalisée grâce à une réaction d'immmunocapture puis d'hémagglutination. Une globuline

humaine anti-IgM fixée sur un support solide (cupule de microplaque) permet la capture des IgM du sérum du patient. Les IgM spécifiques anti-*T. pallidum* sont ensuite révélées par des hématies sensibilisées (réactifs du TPHA).

Cette réaction est d'une grande sensibilité mais de réalisation et de lecture délicate.

ELISA et *Western-blot* IgM

Les méthodes ELISA pour rechercher les IgM par immunocapture sont simples, sensibles et spécifiques. Les fausses négativités IgM liées à la compétition des IgG sont supprimées ainsi que les fausses positivités liées aux anticorps antinucléaires. Seuls les facteurs rhumatoïdes peuvent interférer dans de rares cas.

Le *Western-blot* IgM semblerait de grande valeur pour le diagnostic des syphilis congénitales.

Test d'immobilisation des tréponèmes (TPI) ou test de Nelson et Mayer

Ce test a longtemps été considéré comme la technique de référence mais n'est plus utilisé étant donné les problèmes liés à l'entretien d'animaux vivants infectés par ce pathogène. Il n'est plus pratiqué en France actuellement et peut être remplacé par un test d'immuno-empreinte.

Stratégie de dépistage des tréponématoses

Un logigramme a été proposé afin de proposer une stratégie de dépistage et une place pour les nombreux tests sérologiques disponibles (voir Fig. 33.5).

Interprétation des sérologies

Cinétique des anticorps dans la syphilis non traitée

La cinétique d'apparition des anticorps est la suivante :

- 15 à 30 jours après la contamination : FTA-IgM ou ELISA IgM (+) ;
- puis positivité du FTA-IgG ou ELISA ;
- puis positivité du TPHA/TPPA et du VDRL, 30 à 40 jours après contamination ;
- le titre des anticorps augmente ensuite jusqu'à un titre élevé (≥1280–2560 en TPHA) en phase secondaire (après 6 à 18 mois d'évolution) ;
- il existe une diminution des anticorps en phase de latence (1 à 2 ans après la contamination) avec présence d'un VDRL douteux ou faiblement positif, tandis que les réactions tréponémiques restent positives ;
- on observe ensuite une ré-ascension des anticorps à un taux variable en phase tertiaire, mais le VDRL reste négatif dans 50 % des cas.

Cinétique des anticorps dans la syphilis traitée

- Si le traitement est instauré au début du chancre, les anticorps peuvent rester négatifs.
- Si le traitement a lieu au stade de syphilis primaire, on observe une chute rapide des anticorps et leur disparition en 3 à 6 mois.
- En cas de traitement plus tardif, on note une chute des IgM et du VDRL, mais il persistera très longtemps une cicatrice sérologique en TPHA, ELISA et FTA.
- En cas de traitement tardif au stade tertiaire symptomatique, les réactions sont peu ou pas influencées par le traitement.

Profils sérologiques en fonction du stade de la maladie (Tableau 33.8)

Syphilis primaire

La sérologie est souvent négative au moment du chancre.

Le FTA et l'ELISA IgM sont les techniques sérologiques les plus sensibles à ce stade. Le VDRL est plus sensible que le TPHA, mais il est moins spécifique. Il peut exister des différences de sensibilité entre les réactifs TPHA commercialisés.

Tableau 33.8 **Interprétation des tests sérologiques de la syphilis.**

Résultats des tests sanguins ou sériques			Affection la plus probable
Test non tréponémique : RPR/VDRL	Test tréponémique : TPHA/ELISA	Test tréponémique : FTA-Abs	
–/+	–/+	+	Syphilis primaire si données cliniques compatibles
+ (titre variable)	+	+	Syphilis infectieuse (primaire, secondaire, latente précoce) OU Suivi de syphilis traitée OU Personnes provenant de régions endémiques : pian (par exemple Caraïbes), pinta (par exemple Amérique Centrale) ou bejel
–	+	+	Syphilis traitée OU Syphilis latente tardive de durée inconnue OU Personnes provenant de régions endémiques : pian, pinta ou bejel OU Infection très précoce (syphilis primaire débutante)
+	–	–	Faux positif biologique* (répéter 3 à 4 semaines plus tard)

* Voir tableau 33.6.

Différents profils sérologiques sont observés à ce stade de syphilis primaire (Tableau 33.9).

Syphilis secondaire

Tous les tests sérologiques, tréponémiques et non tréponémiques sont nettement positifs.

Tableau 33.9 Différents profils sérologiques observés au stade primaire.

VDRL	TPHA/ELISA	FTA	Conclusion
–	–	–	Stade très précoce
+	+	+	Profil typique d'infection
±	–	+	Profil rare, le TPHA/ELISA se positive rapidement ensuite. Utilité de renouveler les tests. Contexte clinique à ce stade évocateur (chancre, rapport sexuel récent avec une personne ayant fait une syphilis)
–	+	+	Réinfection au stade précoce avec antécédent de syphilis traitée. Le patient a déjà des taux d'anticorps résiduels, reflet de sa syphilis antérieure

Syphilis latente

La syphilis latente est définie non par des signes cliniques mais par la notion de syphilis acquise dans un délai inférieur à 1 an pour la syphilis latente précoce, et supérieur à 1 an pour la syphilis latente tardive. Aucun test ne permet de déterminer avec certitude si une syphilis est latente précoce ou tardive.

Au stade de syphilis latente précoce, la positivité des tests (TPHA, ELISA, FTA-Abs, VDRL) rend le diagnostic aisé. Au stade de syphilis latente tardive, les résultats des sérologies peuvent être très variables en fonction de l'ancienneté du contage. La différenciation entre une syphilis latente tardive et une cicatrice sérologique repose alors essentiellement sur l'interrogatoire.

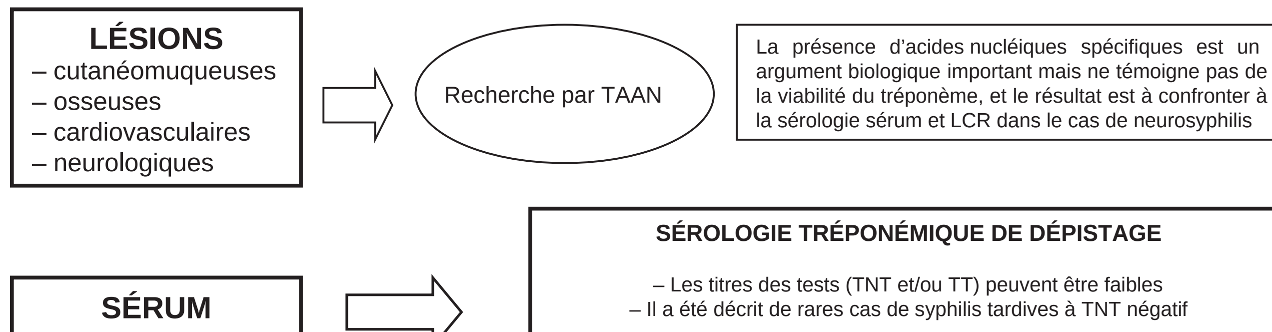
Syphilis tertiaire

La syphilis tertiaire est devenue rare dans les pays industrialisés.

Lors d'une neurosyphilis, les anticorps sont détectés par toutes les méthodes TPHA, FTA-Abs, ELISA, Nelson, VDRL dans le sérum. De façon exceptionnelle, les anticorps lipidiques (VDRL) peuvent avoir disparu.

Diagnostic d'une neurosyphilis (Fig. 33.6)

C'est un diagnostic difficile qui repose biologiquement sur des arguments non spécifiques (hypercellularité du LCR à



LCR
en cas de suspicion de neurosyphilis



Sont classants pour le diagnostic de neurosyphilis :

1. VDRL positif dans le LCR
2. hyperprotéinorachie (plus difficile à interpréter dans le VIH)
3. une réaction cellulaire ≥ 10 éléments/mm

– Le TT est plus sensible mais un test négatif n'exclut pas le diagnostic.
– Le TNT est très spécifique quand il est positif mais peu sensible (75 % des neurosyphilis ont un VDRL négatif dans le LCR).
– L'hypercytose modérée (à prédominance lymphocytaire ou monocytaire, voire plasmocytaire) peut manquer.
– Aucun index (quotients d'Ac et de protéines) n'a fait la preuve de son intérêt en pratique pour affirmer un diagnostic de neurosyphilis. L'inerprétation est plus difficile chez les patients VIH+ (anomalies du LCR en l'absence de syphilis)

Fig. 33.6 Logigramme proposé par le CNR de la syphilis pour le diagnostic biologique de syphilis neurologique ou tertiaire. *(Source : www.cnr-syphilis.fr/algorythmes.php.)*

prédominance lymphocytaire ou de polynucléaires, voire plasmocytaire, hyperprotéinorachie) et sur la démonstration de la production d'anticorps spécifiques dans le LCR.

La positivité du VDRL dans le LCR est très spécifique mais peu sensible. Un VDRL positif dans le LCR indique presque toujours une atteinte du système nerveux central, mais un VDRL négatif n'exclut pas une neurosyphilis.

Un TT positif dans le LCR est un test très sensible mais non spécifique de la neurosyphilis. Un test négatif dans le LCR permet d'exclure un diagnostic de neurosyphilis.

La mise en évidence d'IgM antitréponémiques dans le LCR est en faveur d'une neurosyphilis, mais peut aussi ne résulter que d'un transfert passif. Il faut donc déterminer un index (TPHA ou TPA ou index IgG) pour prouver la production locale d'anticorps spécifiques. Aucun n'a fait la preuve de son intérêt en pratique pour affirmer un diagnostic de neurosyphilis.

Le diagnostic de neurosyphilis est en général posé sur l'association de résultats sérologiques positifs, d'anomalies de la numération cellulaire et/ou de la protéinorachie et de manifestations cliniques. Une recherche par PCR peut être réalisée; sa valeur est variable selon la littérature.

La surveillance biologique d'une neurosyphilis traitée repose sur les tests sérologiques et la vérification du LCR tous les 3 mois jusqu'à normalisation.

Diagnostic d'une syphilis congénitale (Fig. 33.7)

Il existe un risque de transmission maternofœtale au cours de la syphilis, d'où l'intérêt du dépistage systématique chez la femme enceinte. L'examen sérologique prénatal avant le 3e mois de grossesse est obligatoire en France et doit être répété au 3e trimestre chez les femmes à risque et à l'accouchement en l'absence de résultats de sérologie pendant la grossesse.

L'interprétation des sérologies syphilis chez la femme enceinte peut être compliquée par la présence de réactions faussement positives liées à la grossesse; elles sont dans ce cas souvent de faible intensité et dissociées. En cas de positivité d'un des deux tests TT ou TNT, il est indispensable de confirmer le résultat par un test plus spécifique de type *Western-blot* (WB). Si le WB IgG est négatif, un contrôle sur un deuxième sérum est nécessaire pour éliminer une séroconversion. En cas de deuxième sérum négatif, on peut conclure à un faux positif du TT de dépistage et à un TNT positif dû à des anticorps antiphospholipides. La recherche d'IgM chez la femme enceinte permet de faire la différence entre syphilis évolutive et syphilis ancienne guérie; cependant, les IgM peuvent persister longtemps et la transmission au fœtus est possible des années après une syphilis non traitée. Dans le doute, il ne faut pas hésiter à traiter la patiente et instaurer un suivi sérologique de la mère et de l'enfant.

L'interprétation de la présence d'anticorps chez le nouveau-né doit être faite en prenant en considération les antécédents de la mère, y compris le stade de la syphilis, les antécédents thérapeutiques et les résultats des tests sérologiques de la syphilis. Il faut tester des échantillons veineux de la mère et du bébé (tests tréponémiques et non tréponémiques) et tenir compte du passage passif des IgG maternelles.

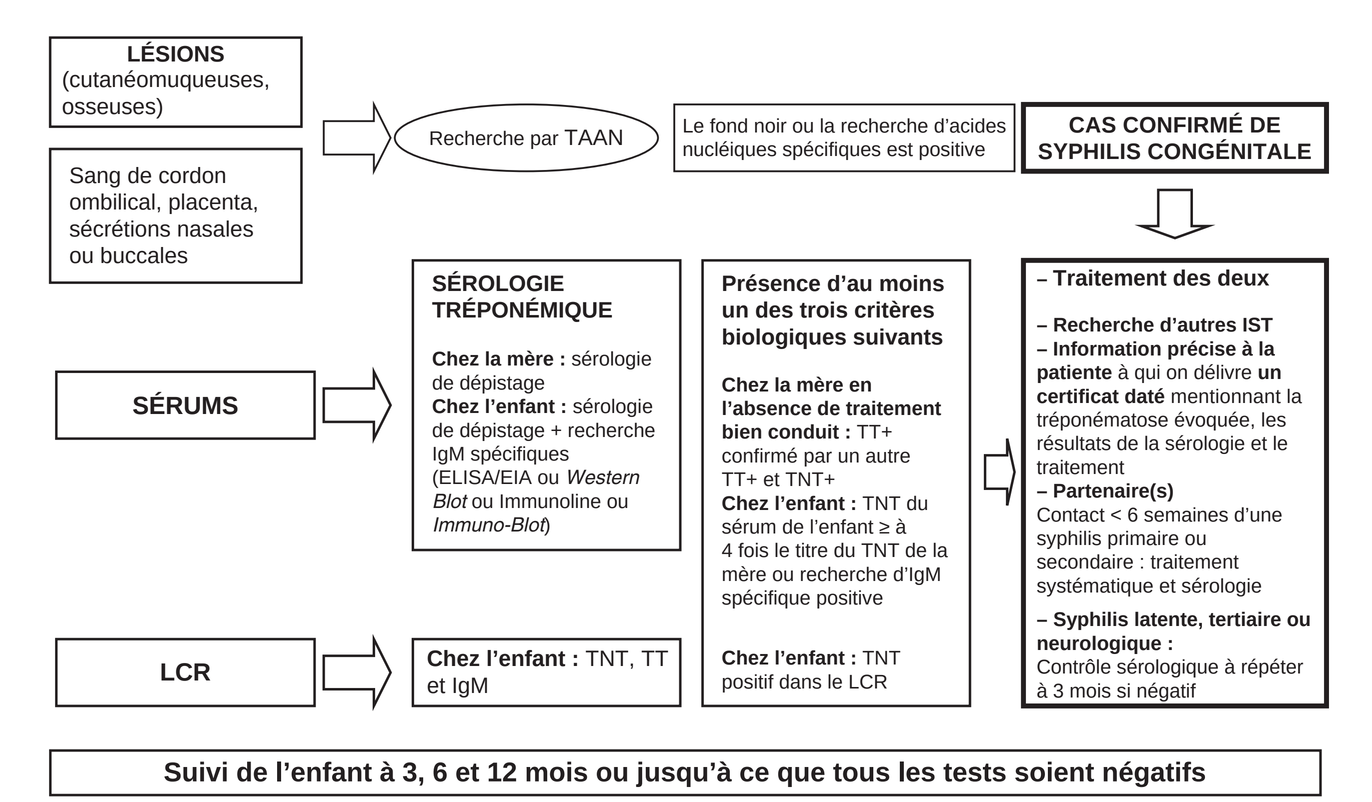


Fig. 33.7 Logigramme proposé par le CNR de la syphilis pour le diagnostic biologique d'une transmission mère–enfant de la syphilis (syphilis congénitale chez un nouveau-né ou un enfant de moins de 2 ans). *(Source : www.cnr-syphilis.fr/algorythmes.php.)*

Le diagnostic repose donc sur :

- des IgM positives (peu sensible) ;
- un titre du VDRL chez le bébé 4 fois supérieur à celui de la mère ;
- une ascension du taux d'anticorps sur deux sérums successifs chez le bébé.

Des prélèvements de placenta, de cordon ou de lésions cutanées du nouveau-né peuvent être observés en microscopie sur fond noir pour déceler *T. pallidum*, mais ils sont peu sensibles. La PCR se révèle un outil intéressant sur ces prélèvements.

Une ponction lombaire doit être effectuée chez le nouveau-né pour effectuer un TT, un TNT et une recherche d'IgM. Un TNT positif confirme une syphilis congénitale.

Les anticorps transmis passivement par la mère disparaissent en 3 à 6 mois chez un enfant non infecté.

Chez un enfant infecté et traité, les anticorps tréponémiques peuvent persister plus longtemps, et seule une diminution significative du titre du VDRL permet de vérifier l'efficacité du traitement.

Syphilis et VIH

Comme la syphilis est une maladie ulcérative sexuellement transmissible, les patients avec une syphilis ont un risque accru d'acquérir ou de transmettre le VIH. Tous les patients chez qui l'on diagnostique une syphilis doivent être testés pour le VIH et ceux suivis pour le VIH doivent avoir un dépistage régulier de la syphilis.

La réponse sérologique syphilitique n'est généralement pas modifiée par l'infection au VIH. Il a été rapporté cependant des séronégativités des tests tréponémiques ou des réponses anormalement faibles ou retardées chez des patients ayant une syphilis secondaire et une infection au VIH. On a également décrit chez ces patients des fausses positivités dans les tests non tréponémiques et une négativation plus rapide du VDRL sous traitement.

Du fait de la possibilité d'évolution vers une neurosyphilis malgré un traitement adapté, certains auteurs préconisent l'analyse systématique du LCR chez les sujets infectés par le VIH et présentant une syphilis primo-secondaire ainsi qu'un traitement plus long avec des doses plus élevées. Cette attitude ne fait actuellement pas l'unanimité.

Problèmes d'interprétation

Lorsque les trois principaux tests, VDRL, TPHA/ELISA et FTA, sont positifs à des taux élevés dans un contexte clinique évocateur, l'interprétation est simple.

En revanche, en l'absence de signes cliniques, l'interprétation de certains profils peut être délicate :

- les sérologies sont dissociées (VDRL négatif, TPHA/ELISA douteux ou faiblement positif, FTA négatif ou douteux) : profil en faveur d'une tréponématose ancienne guérie (anticorps résiduels). Il peut aussi s'agir d'une réaction non spécifique (voir Tableau 33.7). On peut vérifier la spécificité des anticorps par un *Western-blot* ;
- un cas reste possible : une syphilis latente tardive à VDRL négatif (décrite dans la littérature) et dont le diagnostic est improbable, à moins que l'interrogatoire ne retrouve la notion de syphilis acquise et des sérologies antérieures positives diminuant dans le temps en l'absence de tout traitement antibiotique ;
- les trois marqueurs sont positifs à des taux limites de seuil : profil en faveur d'une tréponématose ancienne traitée (anticorps résiduels) ou d'une syphilis évolutive. En cas de traitement, il faut pouvoir comparer à des sérologies antérieures pour observer une diminution du titre des anticorps par le VDRL ;
- des « faux positifs » peuvent exister en VDRL surtout (anticardiolipides), mais aussi en TPHA et FTA (voir Tableau 33.7). En général, les taux sont faibles et les sérologies dissociées ;
- il existe aussi de « faux négatifs » en FTA. Chez les patients séropositifs pour le VIH, on peut observer une négativation totale du TPHA après traitement qui ne se retrouve pas chez les patients immunocompétents ;
- se méfier d'un VDRL rendu négatif alors que le TPHA est très élevé : il peut s'agir d'un phénomène de zone en présence d'un excès d'anticorps. Il faut diluer le sérum pour rechercher une réaction positive.

Traitement

Le traitement de la syphilis repose essentiellement sur des données cliniques.

L'antibiotique de choix est la pénicilline par voie parentérale exclusivement, pour obtenir des taux sériques suffisamment importants. L'antibiothérapie est efficace à tous les stades de la syphilis, mais uniquement sur la multiplication de *T. pallidum* et non sur les complications cardiovasculaires ou neurologiques liées au pouvoir pathogène du tréponème.

Si la syphilis est traitée au moment de l'apparition du chancre, la guérison sera rapide et les sérologies se négativeront rapidement.

Au stade secondaire, après injection de pénicilline, la contagiosité est supprimée en quelques heures, les signes cliniques disparaissent et la guérison sera totale et définitive. Il faut donner des doses croissantes progressives de pénicilline.

Il n'a pas été signalé, à ce jour, de résistances du tréponème à la pénicilline.

D'autres antibiotiques ont été évalués : doxycycline, ceftriaxone, érythromycine et azithromycine. L'érythromycine est active mais ne pénètre pas dans le LCR ou la barrière placentaire. Un essai clinique randomisé important suggère qu'une dose unique d'azithromycine est aussi efficace que la pénicilline dans le traitement des syphilis précoces. Cependant, des échecs sont décrits dus à la résistance intrinsèque de certaines souches de *T. pallidum* aux macrolides.

Quelques études démontrent l'efficacité de la ceftriaxone avec différents schémas.

Il existe de nombreux protocoles thérapeutiques dont deux émanent d'instances internationales : l'OMS et le CDC d'Atlanta. Ils sont résumés dans le tableau 33.10.

Les patients doivent être prévenus d'une possible réaction de Jarisch-Herxheimer qui cause un rash cutané dans les 24 premières heures du traitement. Chez les patients avec une atteinte cardiovasculaire, neurologique ou ophtalmique ainsi que pendant la grossesse, cette réaction peut engendrer de graves complications. L'adjonction de corticoïdes 24 heures avant de débuter le traitement antibiotique est recommandée.

Tableau 33.10 **Traitement de la syphilis (recommandations du CDC).**

Stade	Traitement
Syphilis précoce	
Syphilis primaire	Injection unique de 2,4 x10^6 U de benzathine pénicilline G (Extencilline®) En cas d'allergie à la pénicilline : doxycycline 100 mg × 2/24 h 14 jours ou azithromycine 1 g per os ou ceftriaxone 500 mg IM 10 jours
Syphilis secondaire	
Syphilis latente précoce	
Syphilis tardive	
Syphilis latente tardive	3 injections IM de 2,4 × 10^6 U de benzathine pénicilline G (Extencilline®) à 8 jours d'intervalle En cas d'allergie à la pénicilline : doxycycline 200 mg × 2/24 h 28 jours
Syphilis tertiaire	– Atteinte cutanée et cardiovasculaire : pénicilline 600 000 U par jour pendant 15 à 20 jours (prévention de la réaction d'Herxheimer +++) – Neurosyphilis : 3 à 4 × 10^6 U de pénicilline G toutes les 4 h pendant 10 à 14 jours ou injection IM de pénicilline 2,4 × 10^6 U + probénécide 500 mg × 4 par jour pendant la même durée En cas d'allergie à la pénicilline : doxycycline 200 mg × 2/24 h 28 jours ou ceftriaxone 2 g IM ou IV 10 à 14 jours
Syphilis et VIH	Stade précoce : idem que chez les sujets non infectés par le VIH Neurosyphilis : idem ci-dessus
Syphilis congénitale	
Femme enceinte	2,4 × 10^6 U de benzathine pénicilline G (Extencilline®) en IM et répéter la dose une semaine plus tard Une 3e dose une semaine plus tard est conseillée en cas de syphilis tardive
Enfant	Pénicilline G 50 000 UI/kg par IV en une cure en l'absence de symptômes 150 000 UI/kg/j pendant 10 à 14 jours en cas de symptômes

Conclusion

La syphilis est une maladie pour laquelle la confrontation clinicobiologique est indispensable. Sa recrudescence a traduit un relâchement de la prévention et rappelle de ne pas hésiter à demander une sérologie dans des circonstances variées. Lorsque les signes cliniques sont absents, l'interrogatoire doit permettre de retrouver la notion de syphilis acquise dans le passé, de sérologie antérieure (négative ou positive), de prise d'antibiotiques. Sans ces informations, les tests sérologiques seuls ne permettent pas toujours le diagnostic. En cas de doute, il ne faudra pas hésiter à traiter. Dans la grande majorité des cas, le traitement est simple et consensuel.

Des études à partir de séries de patients bien documentées devraient permettre de mieux définir la place du *Western-blot* et de la biologie moléculaire dans la stratégie diagnostique.

Pour en savoir plus

Andre J, Alacoque B. Tréponèmes pathogènes pour l'homme. In : Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2004 [Section IX, chap. 4].

Basse-Guerineau AL, Assous MV. Les sérologies d'interprétation délicate. Rev Prat 2004 ; 54 : 387–91. Revue.

Bulletin des réseaux de surveillance des infections sexuellement transmissibles (Renago, Renachla, ResIST). novembre 2014. n° 3www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/VIH-sida-IST/Infections-sexuellement-transmissibles-IST/Bulletins-des-reseaux-de-surveillance-des-IST.

Center for Disease Control – MMWR. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. Recommendations and Reports 2015 ; 64 : 1–137 RR3.

Couturier E, Dupin N, Janier M, et al. Résurgence de la syphilis en France, 2000–2001. BEH 2001 ; 35–36 : 168–9.

Egglestone SI, Turner AJL. Serological diagnosis of syphilis. Commun Dis Public Health 2000 ; 3 : 158–62.

European Guideline on the management of Syphilis 2014. IUSTI/WHO European STD Guidelines Editorial Board.

Fahri D, Dupin N. Diagnostic sérologique de la syphilis. Annales de Dermatologie et Vénérologie 2008 ; 135 : 418–25.

French P. Syphilis. BMJ 2007 ; 334 : 143–7. Review.

Ghanem K. Neurosyphilis : a historical perspective and review. CNS Neuro Therap 2010 ; 16 : e157–68. Review.

Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, et al. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis : a systematic review and meta-analysis. Sex Transm Infect 2013 ; 89(3) : 251–6.

Gayet-Ageron A, Sednaoui P, Lautenschlager S, et al. Use of Treponema pallidum PCR in testing of ulcers for diagnosis of primary syphilis. Emerg Infect Dis 2015 ; 21(1) : 127–9.

Grivois JP, Caumes E. Neurosyphilis : quand faut-il y penser ? Rev Prat 2004 ; 54 : 396–9. Revue.

Hagedorn HJ, Kraminer-Hagedorn A, De Bosschere K, et al. Evaluation of INNO-LIA Syphilis assay as a confirmatory test for syphilis. J Clin Microbiol 2002 ; 40 : 973–8.

HAS. Évaluation a priori du dépistage de la syphilis en France. Mai 2007.

Modification de la Nomenclature des actes de biologie médicale pour les actes de recherche du Treponema pallidum (bactérie responsable de la syphilis) ; Mai 2015.

Herremans T, Kortbeek L, Notermans DW. A review of diagnostic tests for congenital syphilis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010 ; 29 : 495–501.

Heymans R, Van der Helm JJ, De Vries HJC, et al. Clinical value of Treponema pallidum real-time PCR for diagnosis of syphilis. J Clin Microbiol 2010 ; 48 : 497–502.
Janier M. Syphilis : aspects cliniques, biologiques et therapeutiques. Rev Prat 2004 ; 54 : 376–82. Revue.
Janier M, Chastang C, Spindler E, et al. A prospective study of the influence of HIV status on the seroconversion of serological tests for syphilis. Dermatology 1999 ; 198 : 362–9.
Lee V, Kinghorn G. Syphilis : an update. Clin Med 2008 ; 8 : 330–3.
Luger AF, Schmidt BL, Kaulich M. Significance of laboratory findings for diagnosis of neurosyphilis. Int J STD AIDS 2000 ; 11 : 224–34.
Mandelbrot L, Marcollet A. Syphilis et grossesse. Rev Prat 2004 ; 54 : 392–5. Revue.
Morshed MG, Singh AE. Recent trends in the serologic diagnosis of syphilis. Clin Vaccine Immunol 2015 ; 22(2) : 137–47.
Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, et al. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. Sex Transm Dis 2003 ; 80 : 411–4.
Peeling RW, Htun Y. Diagnostic tools for preventing and managing maternal and congenital syphilis : an overview. Bull World Health Org 2004 ; 82 : 439–46.
REMIC – Référentiel en Microbiologie Médicale. Société Française de Microbiologie ; 2015.
Schmidt BL. Evaluation of a new particle gel immunoassay for determination of antibodies against Treponema pallidum. J Clin Microbiol 2004 ; 42 : 2833–5.
Schmidt BL, Edjlali M, Luger A. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against Treponema pallidum in patients with primary syphilis. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 1279–82.
Sena AC, White BL, Sparling PF. Novel Treponema pallidum serologic tests : a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. Clin Infect Dis 2010 ; 51 : 700–8 Review.

Chapitre 34

Mycobactéries

C. Martin, F. Denis

PLAN DU CHAPITRE

Généralités

Les mycobactéries sont des micro-organismes responsables de maladies chez l'homme et chez les animaux. En bactériologie, on distingue classiquement les mycobactéries tuberculeuses responsables de la tuberculose des mycobactéries non tuberculeuses, agents de mycobactérioses survenant le plus souvent sur des terrains fragilisés (mucoviscidose) ou immunodéprimés (greffés, sida).

Le diagnostic de tuberculose ou de mycobactériose est un diagnostic clinique, radiologique et bactériologique. La distinction entre ces deux entités ne peut être réalisée qu'au laboratoire.

Le genre *Mycobacterium* est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae* dans l'ordre des actinomycétales auquel appartiennent de nombreux genres (Tableau 34.1). Les mycobactéries se présentent comme des bacilles aérobies ou microaérophiles, immobiles, non ramifiés et non sporulés présentant une propriété tinctoriale essentielle : l'acido-alcoolo-résistance (BAAR) due à la richesse en lipides de leur paroi. Les contraintes techniques d'études des mycobactéries dues à une croissance lente et une structure pariétale complexe ont longtemps retardé l'acquisition des connaissances concernant le genre *Mycobacterium* par rapport à d'autres genres d'intérêt médical. Dans les années 1990, le développement de méthodes de culture rapide en milieu liquide a permis une diminution des délais d'obtention des souches et des antibiogrammes. À la même période, l'avènement des techniques de biologie moléculaire a permis le séquençage du génome complet de *M. leprae*, de *M. tuberculosis* H37Rv puis de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Ces données ont été à l'origine de l'avancée des connaissances phylogénétiques, structurales (enzymes des voies de synthèse des composés pariétaux) et métaboliques et ont eu des retombées dans le domaine diagnostique et clinique, permettant la mise au point de techniques d'identification, de détection et des méthodes d'épidémiologie moléculaire, la découverte de nouveaux mécanismes de résistance aux antituberculeux, et le criblage de nouveaux agents antimycobactériens. Ces avancées ont rendu possible une réponse au clinicien plus rapide et plus précise à chaque étape technique du diagnostic (microscopie, culture, identification et antibiogramme) lors de l'exploration d'une tuberculose maladie.

La génomique comparative des différentes espèces des mycobactéries de la tuberculose a permis la mise au point de méthodes d'exploration in vitro de l'infection tuberculeuse latente (ITL). L'ITL est un état consécutif à la colonisation d'un sujet par le bacille de la tuberculose. Le diagnostic de cette phase asymptomatique reposait jusqu'en 2005 uniquement sur l'étude de l'hypersensibilité cutanée à la tuberculine après injection intradermique (IDR). Cette méthode qui met en évidence une réaction locale est utilisée avant vaccination (sauf chez le nourrisson de moins de 3 mois) et dans la cadre d'enquêtes autour d'un cas de tuberculose. Elle présente des inconvénients (réactions croisées avec le BCG,

Tableau 34.1 Genres appartenant à l'ordre des Actinomycétales.

Actinomycètes aérobies	Actinomycètes aéro-anaérobies	Actinomycètes anaérobies
Actinomadura	*Arachnia*	*Actinomyces*
Streptomyces	*Arcanobacterium*	*Bifidobacterium*
Arthrobacter	*Cellulomonas*	*Eubacterium*
Brevibacterium	*Corynebacterium*	*Mobilincus*
Microbacterium	*Gardnerella*	
*Nocardia**	*Oerskovia*	
*Rhodococcus**	*Propionibacterium*	
*Tsukamurella**	*Rothia*	
*Mycobacterium**	*Turicella*	

* Acido-alcoolo-résistance partielle ou totale.

difficulté de réalisation et de lecture). Des tests in vitro, appelés IGRA (*interferon γ release assay*), sont des analyses mesurant la production d'interféron γ par des cellules mononucléées du sang périphérique après stimulation par des antigènes spécifiques des mycobactéries du complexe *tuberculosis*, mais absents chez les souches de BCG.

Il est classique d'opposer les mycobactéries tuberculeuses responsables de la tuberculose aux mycobactéries non tuberculeuses (MNT) responsables de mycobactérioses. Nous verrons dans ce chapitre que les étapes initiales du diagnostic sont identiques et que seules les épreuves d'identification et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques diffèrent. Parmi ces nouvelles approches, la détection directe du génome bactérien à partir des prélèvements n'a pas montré sa supériorité par rapport à la culture par manque de sensibilité. Les techniques bactériologiques mises en œuvre pour l'étude des mycobactéries sont spécifiques, ce qui oblige chaque laboratoire ayant un secteur de mycobactériologie à s'équiper (hottes aspirantes de type PSM 1, étuves pour conservation longue, milieux spécifiques) et à adopter une organisation particulière dictée par les impératifs techniques (ensemencements, lectures, délais longs). La prévention du risque biologique dans les laboratoires de biologie médicale a été renforcée (arrêté du 16 juillet 2007 publié au *Journal Officiel* le 4 août 2007). Le texte précise les conditions de manipulation des prélèvements susceptibles de contenir des agents infectieux et la manipulation de souches en fonction du niveau de risque, de la classe de l'agent et des conditions d'exposition. Ce texte concerne notamment les mycobactéries de la tuberculose qui appartiennent à la classe 3 et doivent être manipulées dans une zone de confinement de type 3 (niveau de sécurité biologique de niveau 3 [NSB3]).

Le laboratoire de mycobactériologie est également un des pivots de la surveillance de la tuberculose, d'autant plus qu'il a depuis 2002 également la charge de déclarer les nouveaux cas de tuberculose aux autorités sanitaires. Une collaboration étroite est nécessaire entre biologiste et clinicien afin de tout mettre en œuvre pour permettre la guérison du patient et de s'assurer de la mise en place des mesures nécessaires à la non-transmission à l'entourage.

Habitat et pouvoir pathogène

Par leurs aspects cliniques et épidémiologiques, les infections dues à des mycobactéries sont divisées en trois grandes entités : la lèpre (*M. leprae*), la tuberculose, dont les agents étiologiques sont les bacilles tuberculeux (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, etc.), et les mycobactérioses provoquées par les mycobactéries commensales dites « atypiques » (*M. avium*, *M. abcessus*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, etc.).

Actuellement, plus de 140 espèces de mycobactéries ont été décrites. En fonction de leur vitesse de croissance, les mycobactéries sont séparées en deux groupes (mycobactéries à croissance lente et mycobactéries à croissance rapide). La présence d'une seule copie du gène codant l'ARN ribosomal 16S (croissance lente) ou de 2 copies (croissance rapide) est corrélée à la vitesse de croissance. La croissance et le métabolisme lents des mycobactéries concourent certainement à leur capacité à s'adapter aux conditions environnementales (Tableau 34.2). La répartition du caractère pathogène pour l'homme des espèces à l'intérieur de chacun des groupes n'est pas homogène. C'est parmi le groupe des mycobactéries à croissance rapide que l'on retrouve les espèces considérées comme non pathogènes, excepté *M. abscessus*, *M. chelonae* et *M. fortuitum*. Cette observation contraste avec l'analyse du groupe de mycobactérie à croissance lente où sont réunies les espèces pathogènes obligatoires (mycobactéries de la tuberculose, *M. leprae*) ou potentiellement pathogènes (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*). Excepté pour *M. marinum* et *M. ulcerans* (phylogénétiquement proches des mycobactéries de la tuberculose), les autres espèces sont des pathogènes opportunistes qui provoquent des infections chez des patients présentant une immunodépression (cancer, VIH, greffe, corticothérapie, etc.). Cependant, leur isolement à partir de prélèvements polybactériens (pulmonaires le plus souvent) doit conduire le biologiste à confronter ces données aux éléments cliniques et radiologiques pour retenir l'implication dans le processus pathologique de la mycobactérie isolée et faire la différence entre simple colonisation et infection. Des recomman-

Tableau 34.2 **Supports fondamentaux des particularités du diagnostic au laboratoire des infections à mycobactéries.**

Données fondamentales	Propriétés	Etapes concernées
Nombre de copies ADNr 16S		
1 seule copie	Croissance lente	Culture sur milieux riches (Löwenstein-Jensen) et durée d'incubation longue
2 copies	Croissance rapide	Culture sur milieux ordinaires et durée d'incubation courte
Séquences d'insertion répétées	Différenciation *intraspecies*	Épidémiologie moléculaire
Métabolisme lipidique (données génétiques et chromatographiques)	Affinité tinctoriale Hydrophobicité – Résistance aux agents chimiques – Résistance aux antibiotiques hydrophiles	Examen direct (Auramine, Ziehl-Neelsen) Décontamination (soude) Familles d'antibiotiques actives (isoniazide, rifampicine, éthambutol, pyrazinamide)
Gènes du métabolisme aérobie et anaérobie	Adaptation à la tension en oxygène	Incubation en aérobiose
Antigènes polysaccharidiques, protéiques et glycolipidiques	Antigénicité	Possibilité de sérologie mais nombreuses réactions croisées

dations édictées par l'American Thoracic Society (ATS) en 1997 puis réactualisées en 2007 préconisent l'association d'au moins un critère clinique ou radiologique à un critère microbiologique. Les critères cliniques sont définis par la présence de symptômes pulmonaires ou la présence d'anomalies à la radiographie ou au scanner (nodules, micronodules, cavernes, infiltrats, opacités), toutes les autres étiologies ayant été éliminées. Les critères bactériologiques correspondent à l'isolement de la mycobactérie à partir soit de deux expectorations recueillies indépendamment, soit d'un liquide bronchoalvéolaire (LBA), soit encore d'expectorations voire d'un LBA associé à une analyse histologique compatible (granulome).

L'éventail des niches écologiques est varié et certaines espèces sont isolées uniquement à partir de l'environnement, tandis que d'autres ont une spécificité limitée à un hôte unique (*M. leprae*). Seul un nombre restreint d'espèces n'a pas été isolé de l'environnement, dont les mycobactéries de la tuberculose et le bacille de la lèpre qui n'a jamais été cultivé sur milieu inerte. Les niches écologiques pour une espèce donnée ne sont pas toujours bien connues. Les MNT à croissance rapide (groupe IV de la classification de Runyon) sont principalement isolées du sol, de l'eau et, à une fréquence moindre, des végétaux ou des sphaignes. Les MNT à croissance lente potentiellement pathogènes sont également présentes dans le sol, l'eau douce ou de mer, sur les poussières et moins fréquemment sur les végétaux. Certaines mycobactéries sont des pathogènes pour une ou plusieurs espèces animales domestiques (*M. bovis* chez les bovins et caprins ; *M. avium* subsp. *paratuberculosis* chez les bovins ; ou encore *M. avium* subsp. *avium* chez les oiseaux ou les rongeurs). Enfin, *M. ulcerans* (responsable de l'ulcère de Buruli : pathologie déclarée émergeante par l'OMS), dont le biotope est hydrotellurique, a un cycle de transmission complexe où des mollusques herbivores et des insectes sont impliqués respectivement comme hôtes intermédiaires et vecteurs (piqûre). La répartition géographique est très variée et dépend de l'espèce considérée ; certaines, fréquemment isolées dans un pays ou une région, peuvent être rares ou absentes dans une autre zone. La présence des MNT dans l'eau douce et l'eau de mer et leur persistance dans les réseaux d'eau potable (présence dans les biofilms, capacité à survivre chez les amibes) impliquent l'utilisation d'eau stérile lors du prélèvement et à chaque étape du diagnostic au laboratoire. La transmission des mycobactéries se produit lors d'ingestion, par aérosolisation ou lors d'effraction cutanée. La capacité à survivre dans les cellules, à former des biofilms avec les matières organiques et à être aérosolisé avec des hydrates de carbone est conférée par l'hydrophobicité due à la très grande richesse en lipide de la paroi (Tableau 34.2). Cette propriété confère également une résistance naturelle :

- aux désinfectants (ammonium quaternaires, dérivés oxydants, dérivés chlorés, glutaraldéhyde) pouvant être à l'origine de contaminations transmises par fibroscope ;
- aux agents chimiques (bases, acides, détergents) permettant leur utilisation pour éliminer la majorité des bactéries commensales beaucoup plus sensibles à ces produits avant la mise en culture des produits pathologiques ;
- à certains antibiotiques hydrophiles.

Les propriétés physiologiques particulières du bacille tuberculeux (croissance lente avec un temps de division de 20 heures, caractère aérobie) et les propriétés structurales déjà énoncées vont nécessiter la mise en œuvre d'une méthodologie particulière détaillée dans ce chapitre.

Les particularités cliniques et histologiques de la tuberculose découlent de l'équilibre existant entre les facteurs de virulence du bacille de la tuberculose (paroi riche en lipides, enzymes protectrices du stress oxydatif) et les moyens de défense mis en jeu par l'hôte (coopération cellulaire) qui entraîneront la formation du granulome et la nécrose tissulaire (Fig. 34.1). La tuberculose est une maladie chronique contagieuse transmise par voie aérienne affectant principalement le système respiratoire. Le patient tuberculeux est le réservoir de bactéries et émet un aérosol de bacilles lors de la toux, et infectera ainsi les sujets qui auront été à son contact proche. Les particules qui véhiculent les bacilles tuberculeux, une fois inhalées, vont parvenir au niveau de l'alvéole pulmonaire où elles vont être phagocytées par un macrophage. Selon les individus et le terrain, les bacilles vont soit être tués (majorité des cas), soit survivre et se multiplier à l'intérieur des macrophages. Après cette primo-infection qui associe une lésion pulmonaire à une adénopathie satellite, l'hôte réagit à cette primo-infection en initiant une réponse immunitaire innée immédiate et une immunité cellulaire spécifique adaptative en 4 à 6 semaines. Pour la plupart des personnes, l'infection s'arrête à ce stade. Si la mise en place de l'immunité adaptative est trop longue, une dissémination dans l'organisme des macrophages infectés par voie sanguine et lymphatique va provoquer le développement de lésions secondaires pulmonaires (nodules, tuberculomes et cavernes) ou extrapulmonaires (ganglionnaires, ostéoarticulaires [mal de Pott]), rénales, péricardiques, péritonites, méningites, organes hématopoïétiques). Au niveau de ces localisations, l'infection peut être contrôlée par la réaction immunitaire ou évoluer si celle-ci n'est pas mise en place ou si les défenses immunitaires sont amoindries. Par ailleurs, une réinfection d'un patient (souvent chez des sujets âgés) peut survenir et la cinétique des événements physiopathologiques se trouve accélérée. Les mécanismes de la réaction immunitaire mise en jeu lors de l'infection tuberculeuse sont complexes et ne sont pas tous connus. Parmi les mécanismes bien identifiés, on peut citer :

- l'inhibition de la fusion phagolysosomiale ;
- l'activation des macrophages par la production d'interféron γ et la prolifération clonale des lymphocytes par l'interleukine 2 ;
- une augmentation de l'activité métabolique, de la production de TNFα et la production de composés oxygénés toxiques par les macrophages activés.

Démarche diagnostique

La confirmation bactériologique du diagnostic de la tuberculose ou de mycobactériose doit, dans tous les cas, être recherchée. Le diagnostic bactériologique comprend obligatoirement un examen direct et une culture. L'isolement de la souche donnera lieu à une identification et systématiquement à une étude de la sensibilité aux antituberculeux majeurs pour les mycobactéries de la tuberculose. Parmi les techniques de détection (amplification génomique) et de diagnostic rapide (antigènes solubles urinaires, anticorps) récemment développées, seule la détection après amplification présente actuellement un intérêt, surtout en présence de BAAR à l'examen microscopique. En effet, la distinction

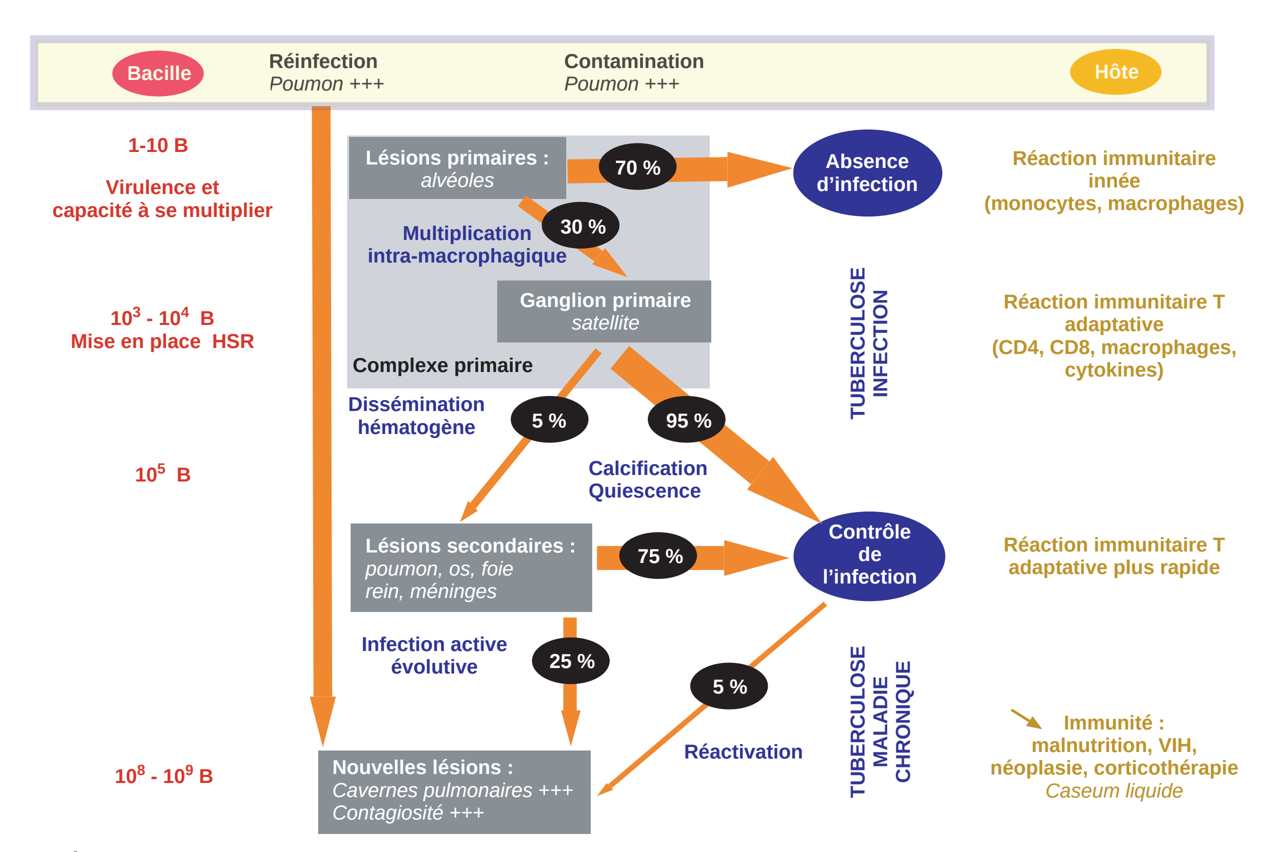


Fig. 34.1 **Équilibre physiopathologique lors de la tuberculose.**

entre mycobactérie tuberculeuse et non tuberculeuse est très importante pour le clinicien afin de prendre la décision d'isoler le patient si celle-ci n'a pas déjà été prise et d'instaurer un traitement antituberculeux spécifique. La détermination de la sensibilité aux antibiotiques est différente selon le résultat de cette étape. Les différentes étapes du diagnostic des mycobactéries sont présentées à la figure 34.2.

Par rapport aux méthodes usuelles de la bactériologie, les particularités du diagnostic des infections à mycobactéries sont liées à leur temps de croissance long et à la nécessité de concentrer et d'éliminer les bactéries commensales des prélèvements (décontamination). Ces particularités induisent respectivement des résultats de culture différés et un travail technique conséquent de préparation des échantillons pour réaliser examen microscopique et mise en culture.

Règles de sécurité et législation

La prévention du risque biologique dans les laboratoires de biologie médicale (arrêté du 16 juillet 2007 publié au *Journal Officiel* le 4 août 2007) concernant les prélèvements susceptibles de contenir des agents infectieux et la manipulation délibérée de souches est fondée sur le niveau de risque en fonction de la classe de l'agent. Les mycobactéries de la tuberculose, mais aussi *Salmonella* Typhi, *Brucella*, etc. appartiennent à la classe 3 et doivent être manipulées dans une zone de confinement de type 3 (NSB3).

Des règles de sécurité strictes doivent donc être observées lors du traitement des échantillons cliniques, de la manipulation des cultures pour réaliser l'identification et l'antibiogramme : utilisation de récipients fermant hermétiquement, observation des règles d'acheminement pour les substances infectieuses, manipulation des prélèvements sous des postes de sécurité microbiologique (PSM), utilisation de centrifugeuses munies de capot de sécurité pour éviter la propagation d'aérosol.

Les examens microscopiques et les mises en culture peuvent être réalisés dans une zone NSB2 afin de transmettre les résultats des examens microscopiques rapidement pour éviter une transmission aérienne au personnel soignant et à l'entourage des patients. Seule la manipulation de culture positive de mycobactéries de la tuberculose en vue de la réalisation d'un antibiogramme doit être réalisée impérativement en zone NSB3.

Prélèvements

Tous les organes peuvent être le siège d'une infection à mycobactéries. Pour la majorité des prélèvements destinés à la recherche de mycobactéries, les techniques de prélèvement ne sont pas différentes des autres recherches. Le biologiste pourra également réorienter le prélèvement en vue de la recherche de mycobactéries en fonction des résultats négatifs de la bactériologie standard et du contexte clinique. La majorité des prélèvements (85 %) ont une origine bronchopulmonaire (expectorations, tubages, aspirations bronchiques). Les autres prélèvements sont essentiellement des prélèvements d'urines, des produits de ponction (liquides céphalorachidiens [LCR], liquides pleuraux, abcès, ganglions) et des biopsies.

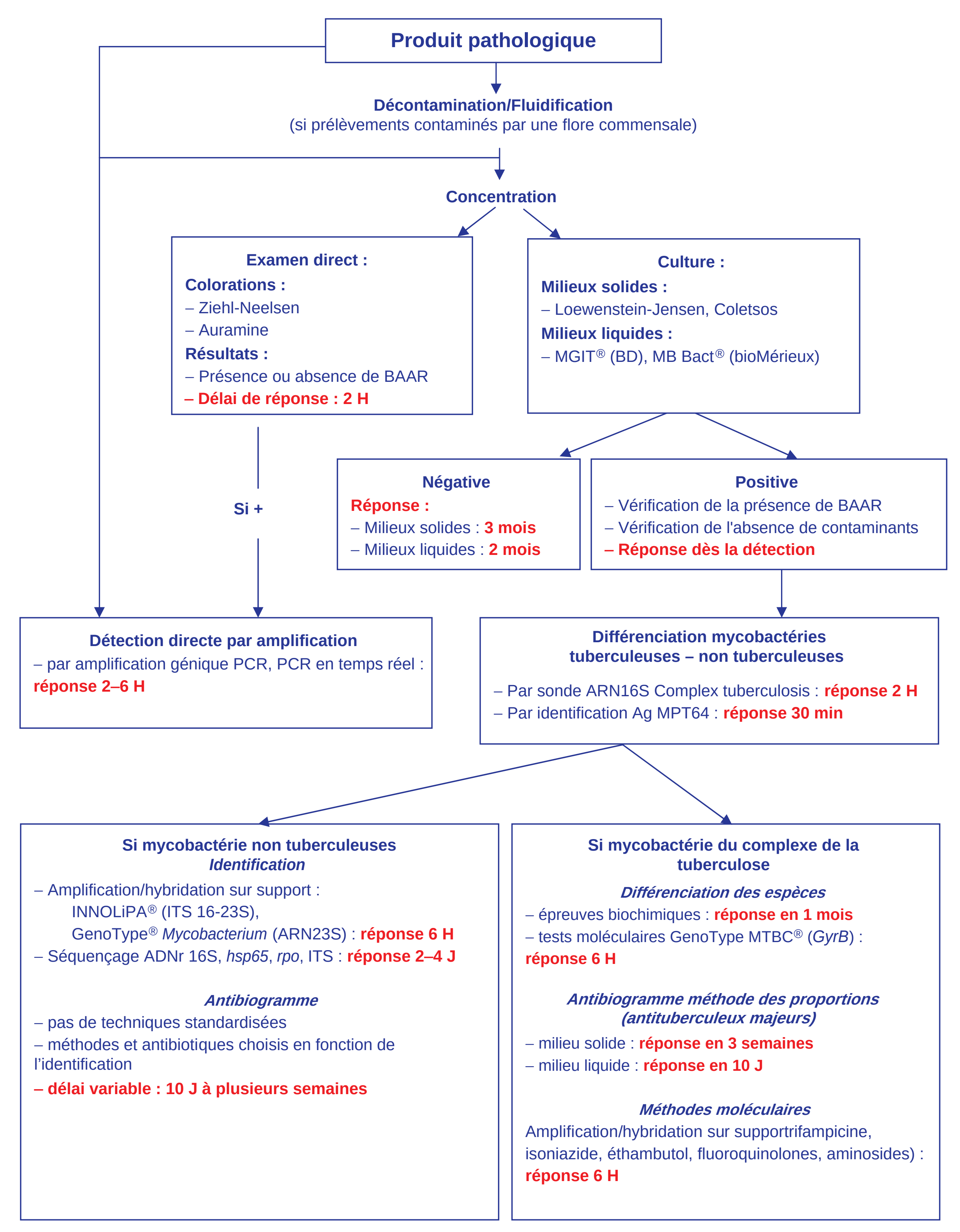


Fig. 34.2 **Principales étapes du diagnostic bactériologique des infections à mycobactéries.**

L'émission bacillaire étant intermittente, les prélèvements bronchopulmonaires (expectorations et tubages gastriques) et urinaires doivent être répétés si possible 3 jours de suite et traités séparément. Les prélèvements initiaux sont réalisés chez des sujets sans antibiothérapie antituberculeuse. Les prélèvements respiratoires (expectorations, tubages gastriques, LBA) sont recueillis dans du matériel stérile, de préférence des tubes à centrifuger à vis de 50 ml fermant de manière hermétique pour éviter tout risque de contamination. Les prélèvements extra-pulmonaires sont recueillis dans des pots stériles. La conservation des prélèvements à 4 °C en vue d'un examen différé de 72 heures permet, en limitant la prolifération des bactéries commensales, un examen fiable (examen direct et culture).

Prélèvements respiratoires

Les prélèvements doivent permettre l'obtention de sécrétions respiratoires profondes et d'éviter les prélèvements salivaires. Les expectorations spontanées sont recueillies après un effort de toux le matin au lever. Si le sujet ne tousse pas, les expectorations sont provoquées par inhalation d'un aérosol de sérum physiologique ou après kinésithérapie.

Les tubages gastriques permettent le recueil des sécrétions bronchiques dégluties au cours de la nuit et sont réalisés au lit du malade chez un sujet alité depuis la veille et à jeun (Encadré 34.1). Les aspirations bronchiques, les brossages et les liquides de lavages alvéolaires recueillis lors d'une fibroscopie sont aussi contributifs dans le diagnostic de tuberculose. Suite à ces examens endoscopiques, les tubages se révèlent souvent positifs.

Deux techniques récemment rapportées permettent de pallier les difficultés rencontrées pour obtenir des expectorations chez les bébés et les enfants et chez les adultes qui ne crachent pas. La première technique repose sur l'inhalation d'un vasoconstricteur (salbutamol, 200 µg) suivie d'une nébulisation d'eau salée (5 ml) et d'oxygène (5 l/min) pendant 15 minutes. Une percussion thoracique suivie d'une aspiration douce des sécrétions nasopharyngées sont réalisées. La seconde utilise un dispositif constitué d'une capsule de gélatine reliée à une ficelle. Après ingestion de la capsule, une stimulation de la sécrétion bronchique par une solution de NaCl à 20 % est réalisée pendant 90 minutes. La capsule est ensuite déglutie et recueillie à l'aide de la ficelle puis soumise aux étapes classiques du diagnostic de laboratoire.

Encadré 34.1 Réalisation du tubage gastrique pour recherche de mycobactéries

Matériel

- Sonde à usage unique après repère de distance cardia et pylore par rapport aux arcades dentaires
- Seringue de 20 ml
- Demi-verre d'eau
- Flacons à prélèvements

Malade

- Assis, tête légèrement en arrière
- Coopératif et prévenu des désagréments : toux, nausée (plus il déglutira, moins l'épreuve sera pénible)

Réalisation pratique

- Amener la sonde en arrière de la langue sans toucher la cavité buccale
- Faire progresser la sonde au rythme des efforts de déglutition jusqu'au repère cardia
- Monter la seringue et aspirer en descendant la sonde jusqu'au repère pylore
- Si aucun liquide n'est aspiré, injecter 5 à 10 ml d'eau, mobiliser la sonde dans l'estomac et réaspirer
- Retirer la sonde et vider l'ensemble sonde–seringue dans un flacon. Si la quantité est faible, chasser le liquide présent dans la sonde avec 2 à 3 ml d'eau

Urines

Après restriction hydrique la veille du prélèvement, 50 ml des urines du matin sont prélevés dans un pot stérile. En pratique, en l'absence de fortes présomptions de tuberculose rénale, seules les urines présentant une pyurie aseptique (leucocyturie supérieure à 10 000/ml) seront ensemencées.

Sang

La recherche de mycobactéries dans le sang est pratiquée à partir d'une ponction veineuse, le sang étant recueilli dans un flacon des systèmes de lecture automatisée disponibles (Myco/F-Lytic®, Becton Dickinson ; MB Blood®, bioMérieux ; VersaTREK Myco®, Thermo Scientific).

LCR et liquides d'épanchements (ascites, pleuraux, articulaires)

Un volume de 3 ml est nécessaire à l'étude cytobactériologique de ces prélèvements. Dans les méningites tuberculeuses, la cytologie montrera une leucocytorachie modérée (100/mm^3) avec une prédominance de lymphocytes. L'étude biochimique menée parallèlement montrera une glycorachie et un taux de chlorure diminué ainsi qu'une protéinorachie légèrement augmentée (< 1 g/l).

Ponctions d'abcès

Le prélèvement à la seringue doit être privilégié et la seringue adressée directement au laboratoire. Les prélèvements à l'écouvillon sont déposés dans un flacon stérile et humidifiés avec quelques gouttes d'eau distillée stérile ou d'eau physiologique stérile.

Biopsies et pièces opératoires

Une bonne collaboration (transmission de résultats d'examen direct et de prélèvements) entre les laboratoires d'anatomie pathologique et de bactériologie permet de conforter et de rattraper certains diagnostics. Le prélèvement effectué stérilement est envoyé dans un flacon stérile contenant un petit volume d'eau stérile. Les prélèvements biopsiques envoyés dans un liquide fixateur (Boin, etc.) sont impropres à l'étude bactériologique. Si le laboratoire est situé à l'extérieur de la structure ayant effectué le prélèvement, celui-ci devra être transporté à 4 °C après avoir été conditionné selon les normes en vigueur.

Décontamination, fluidification, concentration

En fonction du caractère polymicrobien ou monobactérien, les prélèvements vont faire l'objet ou non d'une décontamination. Cette étape a pour but d'éliminer la flore commensale des échantillons qui envahirait les milieux de culture avant la détection des mycobactéries, qui sont des bactéries à croissance lente. Les mycobactéries sont plus résistantes à l'action des antiseptiques, des acides et des bases dilués que les bactéries commensales. Les liquides de ponction, les ponctions de collections fermées ou les biopsies prélevées stérilement sont ensemencées sans décontamination après centrifugation. Les autres prélèvements considérés comme polybactériens (tubages, expectorations, liquides d'aspiration bronchique, urines, abcès fistulisés, etc.) sont soumis à une méthode de fluidification–homogénéisation–décontamination.

La technique la plus fréquemment utilisée (Fig. 34.3) associe l'action décontaminante d'une solution de soude à l'action mucolytique de la N-acétyl-L-cystéine en présence de citrate de sodium. Cette solution de décontamination est mise en présence d'une quantité égale de produit pathologique, puis il faut agiter à l'aide d'agitateur de type Kahn. La décontamination est arrêtée après 25 minutes de contact par neutralisation à l'aide d'un tampon phosphate (pH 6,8). Après 30 minutes de centrifugation à 3000 rpm, le culot est obtenu après élimination du surnageant. Une goutte du culot est déposée sur deux lames en vue de la coloration pour l'examen direct. Le culot est ensuite repris par 1 ml d'eau distillée stérile ou du tampon PBS pour la mise en culture sur milieux solides (Löwenstein, Coletsos) à raison de 0,2 ml déposé en haut de la pente ou de 0,5 ml dans les tubes ou flacons contenant les milieux liquides. Une fraction est conservée pour une recherche de génome par amplification génique qui pourra être réalisée secondairement (examen direct positif, situations cliniques particulières).

Cette méthode est préconisée pour l'ensemencement des prélèvements en milieux liquides. Des réactifs destinés à réaliser cette étape sont commercialisés en coffrets afin de standardiser les procédures (MycoPrep®, Becton Dickinson; MycoProSafe®, J2L Elitech, NacPacRed®; AlphaTec).

D'autres méthodes moins fréquemment répandues, utilisant la soude à 4 % (méthode de Petroff), l'acide oxalique à 5 %, l'acide sulfurique à 4 % ou le chlorure de benzalkonium sont assez agressives. D'autres, plus douces, associant le lauryl-sulfate de sodium et la soude, sont utilisées dans des laboratoires ne réalisant pas de culture en milieu liquide (Tableau 34.3 et Encadré 34.2). La concentration et le temps d'action de l'agent décontaminant sont des paramètres essentiels à respecter strictement afin d'obtenir une élimination des contaminants sans altérer la viabilité des mycobactéries. Un taux de 2 à 5 % de cultures contaminées est admis. Un taux supérieur ou inférieur nécessite un ajustement de la méthode et plus particulièrement le temps de contact avec la soude.

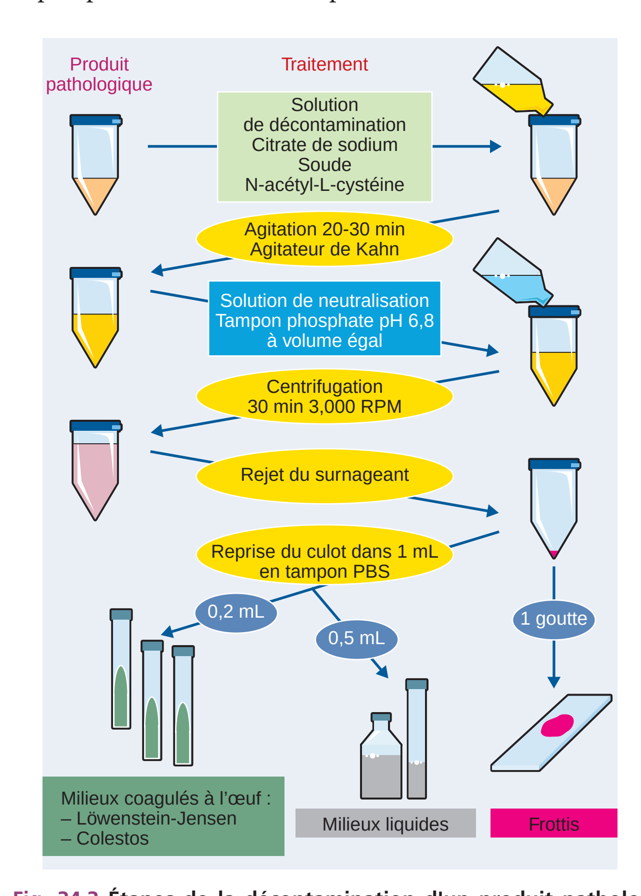


Fig. 34.3 Étapes de la décontamination d'un produit pathologique. Exemple de la méthode de Kubica.

Tableau 34.3 **Caractéristiques des différentes méthodes de décontamination des échantillons en vue de la recherche de mycobactéries.**

Méthode	Agent décontaminant	Agent fluidifiant	Neutralisation	Cultures milieux liquides	Amplification	Remarques
Tacquet-Tison	Soude 1 % Soude 2 %	Lauryl sulfate	Acide sulfurique	–	–	Activité bactériostatique de l'agent fluidifiant, biologie moléculaire non réalisable
Kubica	Soude 1 %	N-acétyl-cystéine 0,5 % Citrate de sodium	Tampon phosphate	+	+	Recommandée si milieux liquides
Petroff	Acide oxalique	Soude 2 %	Acide chlorydrique	+	+	Moindre sensibilité
		0	Tampon phosphate	+	+	Peut être associée à la méthode de Kubica

Encadré 34.2 Homogénéisation et décontamination

Méthode de Petroff (modifiée)

Réactifs

- Solution décontaminante stérile (soude à 4 %)
  - Soude pure en pastilles : 10 g
  - Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
  - Stérilisation à l'autoclave
- Solution de neutralisation
  - Acide sulfurique à 4 %
  - Solution aqueuse de Bleu de tournesol

Technique

- Déposer le prélèvement dans un tube à centrifuger de 50 ml
- Ajouter un volume égal de solution de soude puis agiter
- Mettre le tube à l'étuve à 37 °C jusqu'à homogénéisation (20 à 30 minutes au plus)
- Neutraliser
- Centrifuger à 2000 g (3000 rpm) pendant 20 minutes
- Décanter le liquide surnageant
- Sur chaque milieu de culture : ensemencer 2 à 3 gouttes du culot neutralisé

Méthode au Lauryl-sulfate de sodium

Réactifs

- Solution décontaminante – Lauryl-sulfate de sodium pur : 30 g
  - Soude pure en pastilles : 10 g
  - Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
  - Répartir par flacon de 30 ml et stériliser à l'autoclave
- Solution de neutralisation
  - Pourpre de bromocrésol (1/250) : 2 ml
  - Acide phosphorique pur : 1,5 ml
  - Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
  - Répartir par flacon de 30 ml et stériliser à l'autoclave

Technique

- Mettre le crachat dans un tube à centrifuger à vis de 50 ml
- Ajouter 3 ml de la solution décontaminante à 2 ml de produit pathologique
- Agiter une demi-heure sur agitateur de Kahn (30 minutes)
- Verser 30 ml de solution de neutralisation (jaune)
- Centrifuger à 2000 g (3000 rpm) pendant 20 minutes
- Décanter le liquide surnageant
- Sur chaque milieu de culture : ensemencer 2 à 3 gouttes du culot neutralisé

Méthode de Kubica à la N-acétylcystéine et à la soude

Réactifs

- Solution décontaminante
  - Citrate de sodium ($3H_2O$) : 2,94 g
  - Eau distillée q.s.p. : 100 ml
  - Soude pure en pastilles : 10 g
  - Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
  - Mélanger extemporanément 50 ml de chacune des solutions autoclavées et ajouter 0,5 g de N-acétyl-L-cystéine (NALC)
- Solution de neutralisation (tampon phosphate pH 6,8)
  - Solution A
  - Phosphate disodique : 9,47 g
  - Eau distillée q.s.p. : 100 ml
  - Solution B
  - Phosphate monopotassique : 9,08 g
  - Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
  - Mélanger 50 ml de chacune des solutions puis autoclaver
  - Solution stérile d'albumine bovine (fraction V : 0,2 %)

Technique

- Déposer le prélèvement dans un tube à centrifuger de 50 ml
- Ajouter un volume égal du réactif NALC-NaOH
- Agiter au vortex 30 secondes au maximum
- Agiter 20 à 30 minutes sur un agitateur de Kahn (20 à 25 °C)
- Remplir à le tube avec le tampon phosphate stérile
- Centrifuger 30 minutes à 3000 g
- Décanter le surnageant dans un récipient
- Sur chaque milieu de culture : ensemencer 2 à 3 gouttes du culot neutralisé

La solution d'albumine bovine permet de resuspendre le culot. Cette pratique n'est pas recommandée pour ensemencer les flacons Bactec 12.

Examen microscopique

Les espèces du genre *Mycobacterium* sont difficilement colorées par la coloration de Gram. Le principe des colorations (Ziehl-Neelsen, auramine) des mycobactéries repose sur la propriété d'acido-alcoolo-résistance. Les frottis sont effectués soit après centrifugation (30 minutes de centrifugation à 3000 rpm) pour les prélèvements non contaminés, soit à partir du culot de décontamination pour les autres prélèvements. Les lames utilisées pour la confection des frottis doivent être neuves et éventuellement dégraissées par un mélange acide sulfurique–alcool (90/10). Les solutions de coloration doivent être préparées avec de l'eau stérile (des mycobactéries sont parfois présentes dans l'eau du robinet). Pour les pièces opératoires, on peut également pratiquer des empreintes. Les frottis réalisés doivent être fins, pas trop étalés. Ils sont séchés sur plaque chauffante puis fixés avec de l'alcool méthylique pur.

Il existe deux groupes de technique de coloration (Fig. 34.4). L'examen direct après coloration fuchsine de Ziehl-Neelsen est utilisé pour des petites séries et la confirmation de frottis positif après coloration à l'auramine qui nécessite un microscope à fluorescence. Afin d'éviter la préparation des réactifs et pour mieux standardiser la méthode, de nombreux coffrets de réactifs prêts à l'emploi sont disponibles dans le commerce.

Coloration de Ziehl-Neelsen

Le frottis est coloré par une solution alcoolique saturée de fuchsine basique phéniquée pendant 10 minutes. Après décoloration (3 minutes) avec un mélange acide–alcool (acide sulfurique à 25 % dans l'alcool à 90°), la lame est rincée à l'eau distillée stérile puis contre-colorée 3 minutes par une solution aqueuse de bleu de méthylène à 3 % (Encadré 34.3). Les frottis sont ensuite rincés à l'eau distillée puis séchés

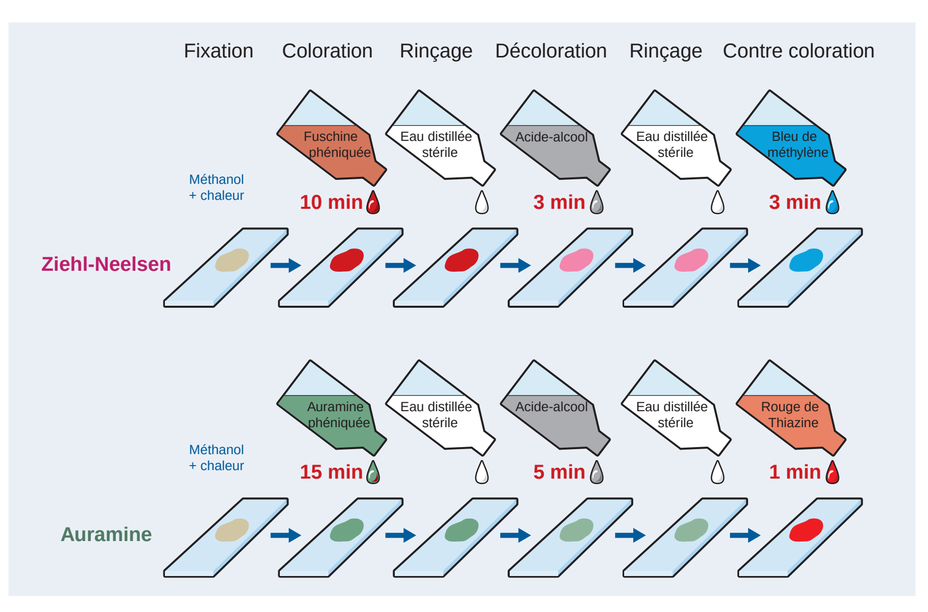


Fig. 34.4 **Étapes de la coloration de Ziehl-Neelsen et de la coloration à l'auramine.**

Encadré 34.3 **Méthodes de coloration – Examens microscopiques**

Méthode de Ziehl-Neelsen modifiée selon IUTC

Réactifs

- Solution alcoolique saturée de fuchsine
  - Fuchsine basique : 0,3 g
  - Éthanol à 95° : 10 ml
- Solution aqueuse de phénol
  - Phénol (cristaux) : 5 g
  - Eau distillée : 90 ml
  - Faire fondre à 95 °C (bain-marie) puis ajouter l'eau
- Solution de travail
  - Mélanger les deux solutions (fuchsine et phénol)
- Solution de décoloration
  - Acide sulfurique à 25 % (v/v)
- Solution de contre-coloration
  - Bleu de méthylène hydrosoluble : 1 g
  - Alcool 95° : 10 ml
  - Phénol : 1 g
  - Eau distillée q.s.p. : 100 ml

Technique

- Couvrir le frottis de fuchsine phéniquée
- Chauffer très doucement jusqu'à l'émission de vapeur
- Le colorant doit agir 10 minutes sans ébullition ni dessèchement
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir le frottis d'alcool 5 minutes
- Couvrir le frottis d'acide sulfurique à 25 % 3 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir le frottis avec la solution de bleu de méthylène, 2 minutes
- Rincer la lame à l'eau stérile et laisser sécher à l'air

Coloration à froid (Kinyou modifiée)

Réactifs

- Solution alcoolique saturée de fuchsine
  - Fuchsine basique : 4 g
  - Méthanol : 20 ml
- Solution aqueuse de phénol
  - Phénol : 48 g
  - Eau distillée : 600 ml
- Solution de travail
  - Mélanger les deux solutions (fuchsine et phénol)
- Solution de décoloration
  - Acide chlorhydrique : 30 ml
  - Éthanol à 95° : 970 ml
- Solution de contre-coloration :
  - Bleu de méthylène hydrosoluble (ou chlorure) : 0,3 g
  - Eau distillée stérile q.s.p. : 100 ml

Technique

- Couvrir le frottis de fuchsine phéniquée 10 minutes sans chauffer
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir le frottis du mélange acide-alcool pendant 3 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir le frottis avec la solution de bleu de méthylène 2 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile et laisser sécher à l'air

Méthode à l'auramine (méthode de Degommier)

Réactifs

- Solution auramine
  - Auramine O : 1 g
  - Eau distillée : 500 ml
- Solution de phénol aqueux
  - Phénol (cristaux) : 1 kg
  - Eau distillée : 100 ml
  - Faire fondre à 95 °C (bain-marie) puis ajouter l'eau
  - Conserver à +4 °C
- Solution de travail
  - Chlorure de magnésium : 2 g
  - Phénol aqueux : 50 ml
  - Eau distillée stérile : 500 ml

▶

- Solution d'auramine : 500 ml
- Mélanger puis filtrer (conserver à +4 °C)
- Solution de décoloration
  - Chlorure de sodium : 5 g
  - Éthanol à 95° : 1000 ml
  - Acide chlorhydrique : 5 ml
- Solution de contre-coloration
  - Rouge de thiazine (solution aqueuse à 0,1 %) : 1 g
  - Phénol aqueux : 50 ml
  - Chlorure de magnésium : 2 g
  - Eau distillée q.s.p. : 1000 ml

Technique

- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir avec la solution d'auramine 20 minutes
- Rincer la lame à l'eau stérile
- Couvrir avec le mélange acide–alcool 3 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir avec la solution de rouge de thiazine, 1,30 minute
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile et laisser sécher à l'air

Méthode à l'auramine (méthode de Smithwick)

Réactifs

- Solution auramine
  - Auramine O : 0,1 g
  - Éthanol 95° : 10 ml
- Solution de travail
  - Phénol à 3 % : 30 g
  - Eau distillée stérile : 500 ml
  - Mélanger les deux solutions (auramine et phénol)
- Solution de décoloration
  - Éthanol à 70° : 100 ml
  - Acide chlorhydrique : 0,5 ml
- Solution de contre-coloration
  - Rouge de thiazine : 0,1 g
  - Phosphate disodique à 0,1 % : 100 ml

Technique

- Fixer la lame, laisser sécher
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir avec la solution d'auramine 5 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir avec le mélange acide–alcool 2 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile
- Couvrir avec la solution de rouge de thiazine, 2 minutes
- Rincer la lame à l'eau distillée stérile et laisser sécher à l'air

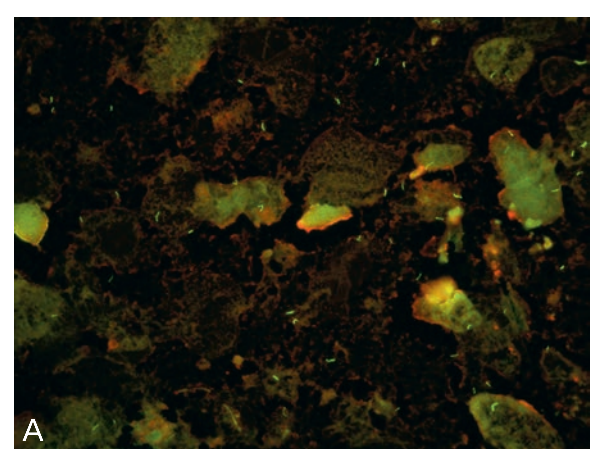
à l'étuve. Une technique à chaud plus longue peut aussi être réalisée. L'observation est effectuée à l'objectif ×100 à l'immersion avec de l'huile minérale. Les mycobactéries colorées par la fuchsine phéniquée apparaissent en rouge vif sur le fond bleu de la préparation (débris cellulaires, mucus, bactéries commensales) (Fig. 34.5A). *M. tuberculosis* apparaît sous forme de bacille long, parfois d'aspect granuleux se regroupant en torsades, ou en cordes si le frottis est réalisé à partir d'un milieu liquide (Fig. 34.5B).

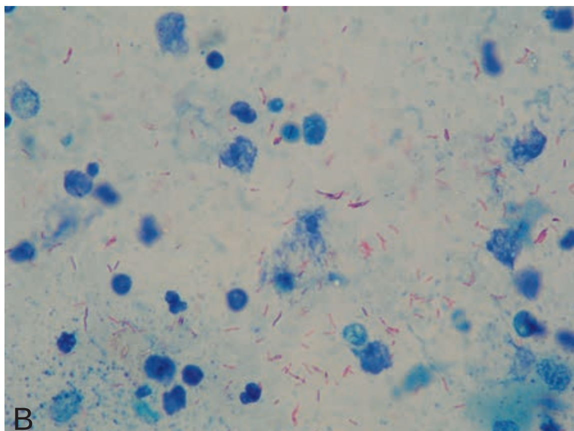
Coloration à l'auramine

Le principe de la coloration est le même que pour la coloration de Ziehl-Neelsen : coloration des bacilles par une solution d'auramine O phéniquée à froid pendant 15 minutes. Après rinçage avec de l'eau distillée, une décoloration pendant 5 minutes par le mélange acide–alcool (acide chlorhydrique-éthanol) est réalisée. Une contre-coloration avec une solution de rouge de thiazine (1 minute) est effectuée après un nouveau rinçage à l'eau distillée (voir Encadré 34.3). Les lames séchées recouvertes d'une lamelle en verre sont observées à l'aide d'un microscope muni d'un dispositif à fluorescence à l'objectif ×25. Les mycobactéries apparaissent comme des bacilles fluorescents jaune-vert sur fond rouge (Fig. 34.5C).

Un frottis est considéré comme négatif (absence d'éléments suspect) après au moins 15 minutes d'observation de la lame par la méthode de Ziehl-Neelsen (300 champs) et au moins 5 minutes par la méthode à l'auramine. La méthode à l'auramine permet d'éliminer rapidement les frottis négatifs et intéresse donc les laboratoires effectuant de grandes séries. Chaque frottis positif devra être contrôlé en recolorant la même lame ou une autre lame par la méthode de Ziehl-Neelsen. L'examen direct ne permettant pas de distinguer les espèces du genre *Mycobacterium*, la réponse signalera la présence ou l'absence de BAAR et exprimera en cas de positivité la densité bacillaire. Par exemple, les réponses seront du type : présence de 10 BAAR/champ ou rapportées selon un système communément utilisé (Tableau 34.4). Des modalités de réponse standardisée sont également disponibles dans le REMIC 2015. Parfois, de très rares formes de BAAR de morphologie plus ou moins altérée peuvent être observées. Dans ces cas, il est prudent de confronter ces résultats aux résultats des examens microscopiques des autres prélèvements de la série (contamination de laboratoire), et parfois d'attendre la positivité des cultures.

L'examen microscopique a une spécificité très élevée, voisine de 100 %. Des faux positifs peuvent être observés si les réactifs utilisés ont été préparés avec de l'eau du robinet (mycobactéries saprophytes) et avec des prélèvements contenant des *Nocardia* ou des bactéries apparentées. La sensibilité est relativement faible : le prélèvement doit contenir 10^5 BAAR/ml pour que la probabilité de positivité de l'examen soit supérieure à 95 %. Pour les frottis présentant moins de 10 BAAR, il est recommandé de contrôler sur un autre prélèvement. Néanmoins, l'examen microscopique demeure une étape incontournable dans le diagnostic, particulièrement en cas de suspicion de tuberculose. La présence de BAAR à l'examen direct dans des prélèvements respiratoires indique que le patient est « bacillifère » et contagieux. Ce résultat doit être transmis au service clinique sans délai en vue de l'instauration d'un traitement antituberculeux et de la prise immédiate de mesures d'isolement si celles-ci n'ont pas déjà été initiées. De même, l'absence de BAAR (après 3 semaines de traitement généralement) à l'examen direct de trois prélèvements consécutifs est nécessaire à la levée des mesures d'isolement du patient.





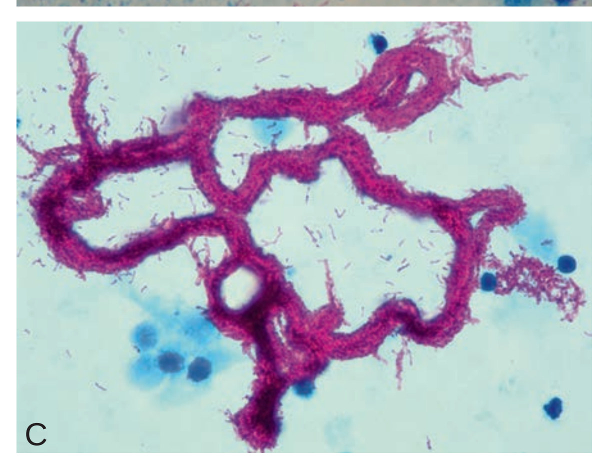


Fig. 34.5 **Examen direct d'un frottis réalisé à partir d'une expectoration.** **A.** Après coloration à l'auramine (grossissement ×400). Présence de bacilles colorés en jaune fluorescent (BAAR). **B.** Après coloration de Ziehl-Neelsen (grossissement ×1000). Présence de bacilles colorés en rose (BAAR). **C.** Après coloration de Ziehl-Neelsen (grossissement ×1000) d'une culture de mycobactéries de la tuberculose en milieu liquide. Présence de bacilles groupés en « cordes ».

Méthodes de culture

La culture des mycobactéries nécessite le recours à des milieux spécifiques et complexes en raison d'une croissance lente (quelques jours à plusieurs semaines) et de la nécessité d'apporter des lipides (voir Tableau 34.2). Les milieux se présentent en tube ou flacon à vis afin de permettre une observation prolongée sans dessiccation et sans création d'aérosols. L'association d'un milieu liquide à des milieux solides est recommandée. Les mycobactéries nécessitent pour la plupart des milieux enrichis et des conditions strictes pour leur croissance (température comprise entre 30 °C et 45 °C, aérobiose et pH optimal situé à 6,7).

Tableau 34.4 **Microscopie semi-quantitative des examens directs.**

Nombre de bacilles observés			Réponse
Auramine (×250)	**Auramine (×400)**	**Ziehl-Neelsen (×1000)**	
Aucun	Aucun	Aucun	Absence de BAAR
1 à 10 en 30 champs	1 à 2 en 70 champs	1 à 2 en 300 champs	Équivoque, à contrôler
1 à 10 en 10 champs	2 à 20 en 50 champs	1 à 10 en 100 champs	Présence de BAAR (+)
1 à 10 par champ	4 à 40 en 10 champs	1 à 10 en 10 champs	Présence de BAAR (++)
10 à 100 par champ	4 à 40 par champ	1 à 10 par champ	Présence de BAAR (+++)
> 100 par champ	> 40 par champ	> 10 par champ	Présence de BAAR (++++)

Milieux solides

Le milieu le plus utilisé pour l'ensemencement des produits pathologiques est le milieu de Löwenstein-Jensen à base de sels minéraux, de fécule de pomme de terre, de glycérine, de vert malachite (antiseptique) et d'œuf (albumine). L'adjonction de certains composés comme le pyruvate de sodium dans le milieu de Coletsos ou le citrate de fer favorise la croissance respectivement de *M. bovis*, *M. africanum* et de *M. haemophilum*. Les milieux sont présentés sous forme de tubes fermés à vis ou par du coton et obturés par une capsule de plastique.

Trois gouttes du culot de centrifugation sont déposées au sommet de la pente gélosée. Deux (si couplés à des milieux liquides) à six tubes sont ensemencés et incubés à 37 °C, excepté pour les prélèvements d'origine cutanée et ostéoarticulaire incubés à 30, 37 et 42 °C. Les tubes sont incubés inclinés et incomplètement vissés afin de permettre l'évaporation de l'excès de liquide de l'échantillon (48 heures). Les milieux sont observés 1 fois par semaine pendant au moins 8 semaines. L'observation des cultures durant la première semaine permettra de mettre en évidence une contamination par des bactéries commensales ou la présence d'une mycobactérie à croissance rapide. Dès l'apparition de colonies, un frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen sera effectué pour vérifier la présence de BAAR avant de déclarer la culture positive. Le nombre de colonies est rapporté ainsi que le délai d'apparition de la culture.

Sur milieu de Löwenstein-Jensen, les colonies de *M. tuberculosis* apparaissent après 2 à 3 semaines d'incubation (Fig. 34.6A) en fonction de la densité microbienne de l'échantillon. Les colonies sont lisses et crèmes sur les cultures jeunes, puis atteignent plus de 5 mm de diamètre et deviennent beiges, rugueuses, à bords irréguliers en chou-fleur dites « eugoniques ». Les colonies de *M. bovis* et *M. africanum*

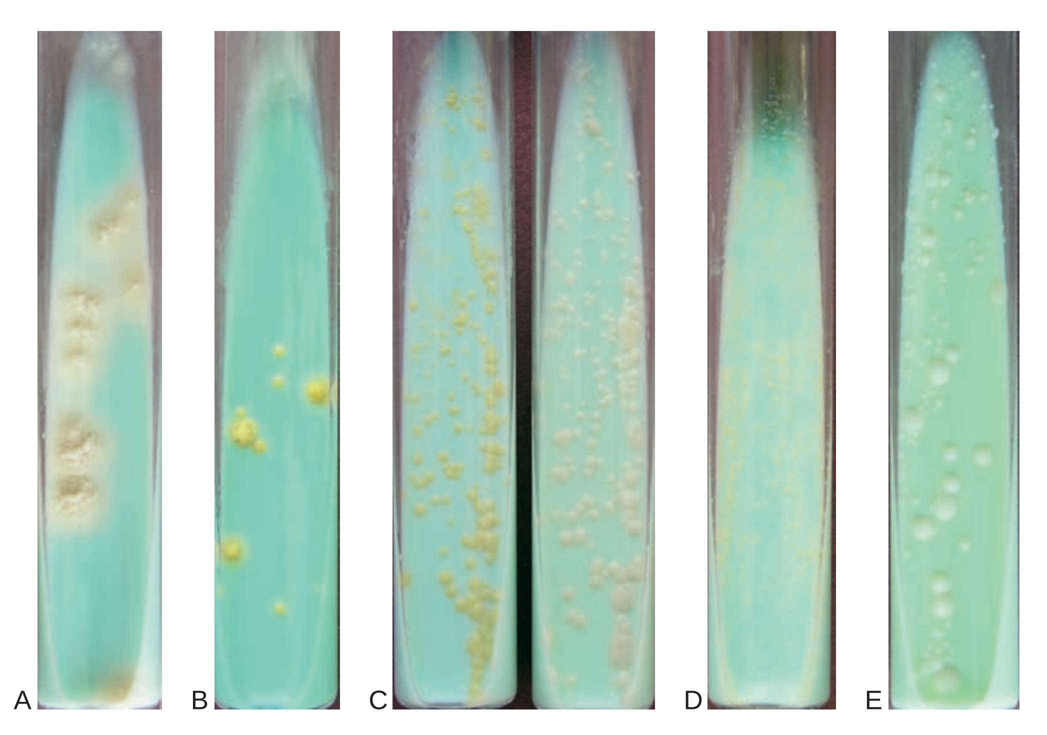


Fig. 34.6 Cultures sur milieu de Löwenstein-Jensen. **A.** Colonies de *Mycobacterium tuberculosis*. **B.** Colonies de *Mycobacterium szulgai* (espèce scotochromogène). **C.** Colonies de *Mycobacterium marinum* (espèce photochromogène). **D.** Colonies de *Mycobacterium xenopi* (espèce non pigmentée à croissance lente). **E.** Colonies de *Mycobacterium chelonae* (espèce à croissance rapide).

ont une croissance plus lente : 3 à 6 semaines sur milieu de Löwenstein. Les colonies de *M. bovis* apparaissent plates, petites (1 à 2 mm), lisses, « dysgoniques », blanchâtres et brillantes, tandis que les colonies de *M. africanum* se présentent avec les caractéristiques suivantes : petites colonies rondes, mates, crèmes et granuleuses.

Les mycobactéries atypiques ont été classées par Runyon selon le délai d'apparition des colonies et leur pigmentation. Les deux espèces de mycobactéries du groupe I à croissance lente et à pigmentation photo-inductible les plus fréquemment rencontrées sont *M. marinum* (Fig. 34.6B) et *M. kansasii*. À 30 °C, les colonies de *M. marinum* (Fig. 34.6C) sont rondes, plus ou moins rugueuses, blanchâtres à l'obscurité et jaune-orangé après exposition à la lumière. *M. kansasii* donnent des cultures avec des colonies irrégulières, eugoniques et jaune citron après exposition à la lumière. Le groupe des mycobactéries scotochromogènes (groupe II) comprend des espèces saprophytes comme *M. gordonae*, ou pathogènes comme *M. szulgai* (Fig. 34.6B). *M. avium* (mycobactéries du groupe III à croissance lente et non pigmentées) présente des colonies fines, rondes, bombées, lisses, brillantes, blanchâtres, crèmes sur les vieilles cultures. *M. xenopi* (Fig. 34.6D), appartenant à ce même groupe, présente des colonies fines, lisses, qui deviennent jaunes sur les vieilles cultures. Parmi les mycobactéries appartenant au groupe IV des mycobactéries à croissance rapide (inférieure à 7 jours), l'espèce *M. chelonae* présente des colonies lisses non pigmentées (Fig. 34.6E).

Milieux gélosés semi-synthétiques

Des milieux semi-synthétiques transparents (Middlebrook 7H10 et 7H11) contiennent des sels minéraux, du pyruvate de sodium, de l'hydrolysat de caséine (7H11) et nécessitent l'adjonction extemporanée d'un supplément contenant acide oléique, dextrose albumine et catalase lors de leur préparation et une incubation sous 5 % de CO_2. Ils demeurent cependant moins performants lors de la primoculture. Les colonies de *M. tuberculosis* sont plates, sèches et rugueuses. La croissance de *M. tuberculosis* est un peu plus précoce (milieu transparent), mais l'observation des colonies est plus difficile que sur les milieux à l'œuf et nécessite parfois une observation à la loupe binoculaire.

Milieux liquides

Les milieux liquides sont fabriqués pour la plupart avec la même base (7H9) et doivent être supplémentés avec des facteurs de croissance rendus sélectifs à l'aide d'un mélange d'antibiotiques (afin d'augmenter la spécificité de la culture). Certains de ces milieux peuvent être couplés à une détection automatique de la croissance (MGIT 960®, BacT/Alert 3D®, VersaTREK®).

Méthode MGIT

À l'aide d'une pipette en plastique à usage unique, 0,5 ml de l'échantillon est inoculé dans un flacon auquel 0,8 ml d'un mélange constitué par le supplément inhibiteur Panta (polymyxine B, azlocilline, acide nalidixique, triméthoprime et amphotéricine B) et du stéarate de polyoxyéthylène ont été préalablement ajoutés afin d'augmenter la spécificité de la culture. Le milieu MGIT (*mycobacteria growth indicator tube*) est un milieu 7H9 supplémenté contenant un indicateur de fluorescence sensible à la concentration du milieu en O_2 composé. Une diminution de la concentration en O_2

génère, après excitation à 365 nm, une fluorescence visible à l'œil nu ou détectable à l'aide d'un automate (MGIT® 960, Becton Dickinson). L'inoculation des tubes ne nécessite pas l'utilisation d'aiguille.

BacT/Alert 3D®

La croissance dans les flacons BacT/Alert MP® (bioMérieux) est détectée à la base du flacon par un indicateur colorimétrique sensible à l'augmentation du pH (présence de CO_2) reconnue par l'automate (BacT/Alert 3D®). L'ensemencement des flacons, supplémentés par un mélange Pantav contenant de la vancomycine en plus des antibiotiques contenus dans le mélange Panta, nécessite le recours à une aiguille.

Versatrek®

Le système Versatrek® (Thermo Scientific) est fondé sur la surveillance de la diminution de pression intervenant dans le flacon de culture due à la consommation d'O_2 lors de la croissance bactérienne.

Bio FM®

Le milieu Bio FM® (Biorad) est un milieu liquide Middlebrook 7H9 enrichi en OADC contenant un substrat chromogène. Les cultures positives présentent une coloration bleue virant parfois au violet.

Hémocultures

Des milieux pour hémocultures disponibles pour les systèmes automatisés de détection (Bactec FX Myco/F lytic®, BacT/Alert MB Blood®, VersaTREK Myco®) contiennent de la saponine qui permet la lyse des cellules et du SPS comme anticoagulant.

L'existence de faux négatifs (examen direct positif et culture négative) est liée le plus souvent à l'instauration d'un traitement chez le patient (prélèvement de contrôle), mais peut aussi se présenter avec des prélèvements paucibacillaires. Un pourcentage plus élevé (15 %) de recouvrement de cultures positives et un délai de détection plus court avec les systèmes utilisant des milieux liquides par rapport aux milieux solides (12 jours en moyenne) sont observés. Toutefois, le recours en parallèle à un milieu solide demeure nécessaire pour accroître le taux d'isolement, pour détecter les cultures mixtes et pour obtenir une culture en cas de contamination du milieu liquide.

La confrontation du délai de positivité des cultures avec les résultats de l'examen direct permet de détecter les erreurs de lecture (examen direct négatif avec une culture positive abondante). Comme pour l'examen direct, il est prudent de confronter le résultat d'une culture aux résultats de la série (contamination de laboratoire).

Identification à partir des cultures

Les techniques de biologie moléculaires d'identification ont supplanté les méthodes biochimiques. Dans ce paragraphe, nous nous limiterons à la description des techniques moléculaires couramment utilisées dans les laboratoires de mycobactériologie, puis nous présenterons une synthèse des épreuves biochimiques d'identification de routine. L'utilisation des méthodes moléculaires a permis de s'affranchir, dans la plupart des cas, de l'étude longue et fastidieuse des caractères métaboliques. Les régions de l'ADN les plus fréquemment ciblées par ces techniques sont les gènes codant les ARN 16S, les séquences intergéniques 16-23S, ARNr 23S, *recA*, *gyrB*, *hsp65* et *rpoB*. Seuls certains tests phénotypiques (niacine, nitrate réductase) sont encore utilisés couramment.

Stade initial : différenciation entre mycobactéries du complexe de la tuberculose et mycobactéries non tuberculeuses

Le premier stade de l'identification a pour but de différencier les mycobactéries de la tuberculose des autres mycobactéries. Cette étape n'est réalisée qu'après contrôle microscopique de la présence de BAAR sur les milieux de culture. Deux techniques (hybridation en milieu liquide et immunochromatographie) sont actuellement disponibles. Une sonde monospécifique (*Mycobacterium tuberculosis* Complex, Accuprobe®) d'ADN complémentaire d'ARN ribosomal-16S marquée par un ester d'acridinium est mise en présence d'un lysat de culture préparé à partir de milieux solides ou liquides. Après hybridation avec l'ARN ribosomal et élimination des fragments de sonde non hybridés, la sonde hybridée est détectée par chimioluminescence à l'aide d'un luminomètre. Cette sonde présente de très bonnes sensibilité (100 %) et spécificité (proche de 100 %). Seules quelques rares souches de *M. terrae* et de *M. celatum* ont produit un signal de faible intensité proche du seuil de détection. Une technique immunochromatographique, reposant sur la mise en évidence de l'antigène MPT64, permet une identification des isolats du complexe *tuberculosis* en 15 minutes. Des résultats faussement négatifs avec des isolats de *M. bovis* BCG ont été rapportés avec cette technique. L'avantage de ces méthodes est l'utilisation unitaire ou en petite série et la rapidité de la réponse fournie aux cliniciens (15 minutes à 2 heures). Un résultat positif permet de conforter le clinicien dans son choix thérapeutique ou d'instaurer un traitement antituberculeux.

Pour les mycobactéries atypiques, des informations peuvent être obtenues de l'observation de la primoculture des milieux solides : aspect, délai d'apparition et pigmentation des colonies, ces deux dernières caractéristiques étant à la base de la classification de Runyon (Fig. 34.7).

Identification phénotypique

L'identification phénotypique est de plus en plus abandonnée au profit des techniques de biologie moléculaire par les méthodes moléculaires (pour plus de détails, se reporter à l'édition précédente).

Différenciation des espèces du complexe de la tuberculose

Le diagnostic précis d'espèces des mycobactéries du complexe de la tuberculose par les méthodes phénotypiques

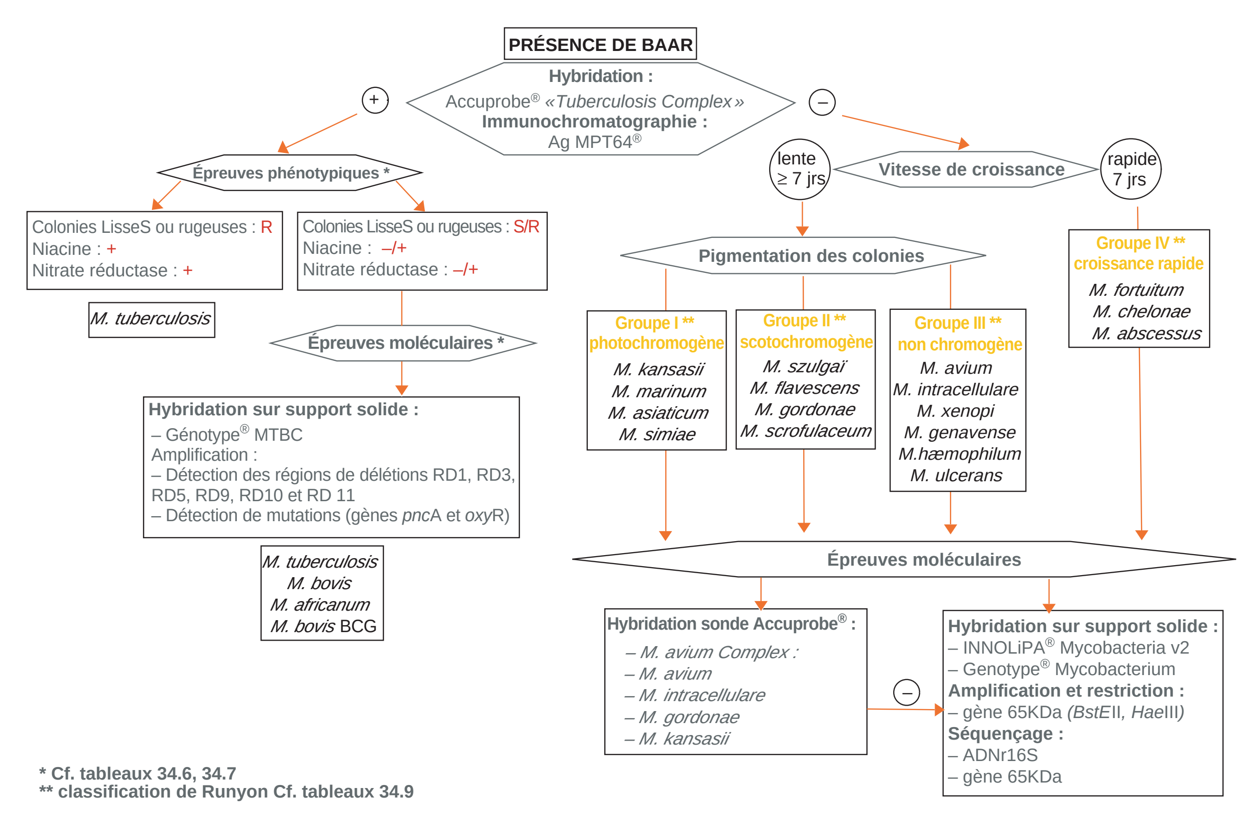


Fig. 34.7 **Arbre décisionnel pour l'identification des mycobactéries au laboratoire.**

(production de niacine [acide nicotinique]), de nitrate réductase associée à la croissance en présence de TCH [acide 2-thiophène carboxylique] et en présence de D-Cyclosérine® (bioMérieux) (Tableau 34.5 et Encadré 34.4) est abandonné au profit de la détection du polymorphisme du gène *gyrB* (GenoType® MTBC, Hain Diagnostika) (Fig. 34.7).

Mycobactéries atypiques

Les épreuves d'orientation reposaient principalement sur l'étude de la morphologie des bacilles à l'examen microscopique et des colonies sur milieux solides, des critères utilisés dans la classification de Runyon (vitesse de croissance et pigmentation de la souche), sur la recherche d'une activité catalasique. Des tests culturaux (sensibilité à des substances antibacillaires, assimilation de substrats, croissance sur milieux ordinaires) et des épreuves biochimiques de mise en évidence d'activités enzymatiques permettaient ensuite une identification biochimique complète.

Identification génotypique

Différenciation des espèces du complexe de la tuberculose

La distinction entre *M. bovis* et les souches de BCG ainsi que l'identification de quelques variants de *M. tuberculosis* nécessitent parfois la détermination de caractères génotypiques (Tableau 34.5). Ces tests reposent sur la mise en évidence de régions de délétions (RD1, RD4, RD9) et sur la détection de mutations des gènes *pnc*A et *oxy*R. Récemment, un coffret a été commercialisé (Hain Diagnostika/Biocentric) fondé sur la détection du polymorphisme du gène *gyrB* (GenoType® MTBC) par PCR multiplex. Ce coffret permet d'identifier précisément en une seule étape les mycobactéries de la tuberculose, excepté *M. africanum* génotype I indissociable de *M. tuberculosis*.

Identification des mycobactéries atypiques

Les méthodes d'identification moléculaire sont réalisables à partir de culture en milieux solides ou liquides. Le principe et les espèces identifiées par ces techniques commercialisées sont précisés dans le tableau 34.6. Ces techniques peuvent être classées en trois grands groupes selon leur spectre d'identification : les sondes monospécifiques, les systèmes de détection après amplification et hybridation sur support solide identifiant une 10 à 16 espèces et enfin les systèmes de détection universelle fondés sur le séquençage ou la restriction enzymatique. La stratégie d'utilisation de ces techniques doit tenir compte du coût, de l'épidémiologie (plus de 50 % des souches isolées dans un laboratoire sont des mycobactéries de la tuberculose) et de critères d'orientation (pigmentation, vitesse de croissance). Les techniques universelles de séquençage permettant une approche sans a priori de l'espèce sont utilisées en seconde intention.

Sondes commercialisées

Des sondes commercialisées (Accuprobe®, Gen-probe, bioMérieux), fondées sur le même principe que la sonde *Mycobacterium tuberculosis complex*, sont disponibles pour les mycobactéries du complexe aviaire (MAC), *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* et *M. gordonae*. La spécificité est bonne pour l'ensemble de ces sondes. En revanche, la sensibilité est variable : 100 % pour *M. gordonae*, 95 % pour *M. avium* et *M. intracellulare*.

Tableau 34.5 Caractéristiques **phénotypiques et génotypiques des mycobactéries du complexe de la tuberculose.**

Espèces / Caractères	*M. tuberculosis*	*M. africanum*	*M. bovis*	*M. caprae*	*M. pinnipedii*	*M. microtii*	BCG
Hôte							
Fréquence d'isolement	+++++	++	++	+	+	+	++
Caractères phénotypiques							
Morphologie des colonies	Rugueuse	Eugonique	Lisse	Lisse	Lisse	Lisse	Rugueuse
Niacine	+	+/–	–	–	–	–	–
Nitrate réductase	+	+/–	–	–	+/–	+	–
TCH	R	R/S	S	S	R/S	S	S
Pyrazinamide	S	S	R	S	S	S	R
Tb1	S	S/R	S	S	S	S	R
D-cyclosérine	S	S	S	S	S	S	R
Caractères génotypiques							
mpt40	+	+	–	–	+	–	–
pnc A (nucléotide 169)	C	C	G	C	C	C	G
oxy R (nucléotide 285)	G	G	A	A	C	C	A
Spoligotype : spacers 39-43	Présence (1 à 5)	Variable	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
RD 1	+	+	+	+	+	+	–
RD 4	+	+	–	+	+	+	–
RD 9	+	–	–	–	–	–	–
RD12	+	+	+	–	+	+	–

Encadré 34.4 **Recherche de la production d'acide nicotinique et de la présence d'une nitrate réductase**

Recherche de l'acide nicotinique par bandelette (Niacin Test®, Difco)

Technique

- Déposer à la surface d'une culture sur milieu de Löwenstein 1 ml d'eau distillée stérile (si possible additionnée de 1 % de Tween 80®).
- Laisser le tube incliné pendant 20 minutes et recueillir l'eau dans un tube à hémolyse
- Tremper la bandelette imprégnée de réactif dans le tube à hémolyse
- Laisser à température ambiante pendant 15 à 20 minutes en agitant de temps en temps

Test positif = coloration jaune de la suspension
Test négatif = absence de coloration de la suspension
Témoin positif : coloration jaune avec culture de *M. tuberculosis*

Réduction des nitrates (épreuve de Virtanen)

Technique

- Une anse de mycobactéries à étudier est émulsionnée dans 2 gouttes d'eau distillée stérile dans un tube à hémolyse.
- Ajouter 2 ml d'une solution à 0,085 % de nitrate de sodium
- Incuber 2 h à 37 °C
- Ajouter 0,2 ml du réactif A et 0,2 ml du réactif B
- Réaction + = coloration rose à rouge résultat de la réduction des nitrates en nitrites par la nitrate réductase
- Si pas de coloration, *ajouter une pincée de poudre de zinc* : le zinc réduit les nitrates encore présents en nitrites, une coloration rose apparaît ; la réaction est négative (bactéries sans nitrate réductase)
- Si au contraire, la teinte du milieu reste inchangée, le stade nitrite a été dépassé (bactéries ayant une nitrate réductase très active)

Témoin positif = culture de *M. tuberculosis*
Témoin négatif = culture de *M. bovis*.
Réactifs

- Solution de nitrate de sodium
  - Nitrate de sodium : 0,085 g
  - Eau distillée : 100 ml
- Réactif A de Griess
  - Acide sulfanilique : 0,80 g
  - Acide acétique : 30 ml
  - Eau distillée : 100 ml
- Réactif B de Griess
  - Alpha naphtylamine : 0,50 g
  - Acide acétique : 30 ml
  - Eau distillée : 100 ml

Détection du polymorphisme de séquence de gènes à l'aide de coffrets commercialisés

D'autres méthodes moléculaires (hybridation sur support solide après amplification par PCR) permettant d'identifier une souche (GenoType Mycobacterium CM et AS®, Hain Diagnostika-Biocentric, INNOLiPA Mycobacteria®, Innogenetics) sont disponibles (Tableau 34.6) et permettent d'identifier les espèces habituellement isolées en pratique médicale. Le kit INNOLipA Mycobacteria®v2 permet, à l'aide de 22 sondes spécifiques situées dans la région inter 16-23S, de distinguer 16 espèces, tandis que le coffret GenoType Mycobacterium® permet d'identifier 14 espèces à l'aide des 17 sondes positionnées au niveau de l'ADNr23S. Des difficultés d'identification sont signalées pour des souches appartenant au complexe *avium-intracellulare* avec ces deux coffrets, témoignant de la nécessité d'une clarification taxonomique de ce groupe ; l'espèce *M. chimaera* est identifié à l'espèce *M. intracellulare*. Le coffret GenoTypeMycobacterium AS® permet l'identification de 16 espèces.

Séquençage

Les souches non identifiées ou pour lesquelles une incertitude demeure font l'objet d'une confirmation par séquençage. Le séquençage de l'ADNr 16S, des gènes *hsp65, rpoB* et *its* permet d'identifier la majorité des espèces d'intérêt médical après comparaison de la séquence obtenue auprès de banques de données disponibles sur Internet (Blast, Ridom). Les positions 590-609 et 182-202 sont respectivement spécifiques de genre et d'espèce. Le séquençage d'autres gènes (*rpoB*, *its*) est possible, mais les banques de données concernant ces cibles sont incomplètes.

Détection génomique

Pour pallier la lenteur relative des méthodes de cultures, même si celles-ci ont vu leur temps de réponse significativement raccourci avec les cultures en milieu liquide, de nombreuses techniques de détection et d'amplification du génome des mycobactéries de la tuberculose ont été mises au point puis commercialisées.

La PCR a été utilisée dès le début des années 1990 pour la détection des mycobactéries et principalement celle de la tuberculose. Il existe une étape d'hybridation à l'aide d'une sonde dont les cibles sont variées (ADN 16S, espace inter-16-23S, séquence d'insertion IS*6110*, Ag 38KDa, Ag 65 KDa).

Les techniques de détection génomique après amplification sont réalisées sur des produits pathologiques décontaminés (soude et N-acétyl-L-cystéine) et concentrés. Les étapes d'extraction des échantillons, d'amplification et de détection des produits amplifiés doivent respecter des procédures qui sont précisées dans un autre chapitre afin de protéger les manipulateurs et de prévenir la survenue des résultats faussement positifs.

L'extraction constitue une étape préalable indispensable à la détection de l'ADN des mycobactéries et peut être réalisée avec des résultats satisfaisants en utilisant des coffrets d'extraction adaptés à différents types de prélèvements (tissus, sang) qui incluent des microcolonnes de purification (Quiagen). Maintenant, des automates d'extraction permettent d'obtenir des résultats équivalents.

Pour éviter le monopole lié à l'utilisation de la *Taq* polymérase, de nombreux procédés ont été mis au point pour amplifier des séquences génomiques.

Les méthodes de détection (colorimétriques ou fluorimétriques) des produits amplifiés sont variées et de plus en plus souvent automatisées, et permettent une détection des produits en temps réel au fur et à mesure du déroulement de la réaction d'amplification (PCR en temps réel) pour cer-

Tableau 34.6 **Principe et caractéristiques des méthodes moléculaires d'identification des mycobactéries à partir de cultures.**

Méthode	**Accuprobe®**	**INNO-LiPA® *Mycobacterium* v2**	**GenoType® *Mycobacterium* CM**	**GenoType® *Mycobacterium* AS**
Fabricant	Gen Probe	Innogenetics	Hain dignostika	Hain dignostika
Principe de détection	Hybridation ARN/ADN	Hybridation ADN/ADN	Hybridation ADN/ADN	Hybridation ADN/ADN
Gène cible	ARN 16S	ITS 16-23S	ADN 23S	ADN 23S
Étape d'amplification	–	Point final	Point final	Point final
Type de méthode	Monospécifique	Polyspécifique	Polyspécifique	Polyspécifique
Temps d'exécution	2 H	5 H	5 H	5 H
Espèces				
MTB*	+	+	+	+ (4 génotypes)
MAC**	+			
MAIS***	+			
M. avium	+	+	+	+
M. intracellulare	+	+	+	+
M. kansasii	+	+ (3 génotypes)	+	+
M. gordonae	+	+	+	+
M. chelonae		+ (4 génotypes)	+	+
M. abscessus		+	+	+
M. scrofulaceum		+	+	+
M. interjectum		+	+ (I et II)	+
M. celatum		+	+	+
M. fortuitum complex		+	+	+
M. szulgai		+	+	+
M. phlei		+		+
M. malmoense		+		+
M. marinum/ulcerans		+		
M. peregrinum				
M. haemophilum				
M. simiae				
M. mucogenicum				
M. smegmatis				
M. genavense/triplex				
M. gastri				
M. asiaticum				
M. shimoidei				
M. goodi				
M. mucogenicum				
M. heckenshornense				
M. lentiflavum				

* Mycobactéries du complexe de la tuberculose.
** Mycobactéries du complexe *avium*.
*** *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum.*

taines d'entre elles (Tableau 34.7). Les méthodes de détection des produits amplifiés sont variées et font appel à des agents intercalants ou des sondes. Les principaux avantages de ces techniques sont l'absence d'étapes post-PCR, avec pour conséquences une rapidité de la technique, du rendu des résultats, une diminution des risques de contamination et la possibilité d'ajouter des contrôles internes co-amplifiés et co-révélés.

Les principaux coffrets commercialisés sont :

- le test classique de PCR (Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test®, Roche ; MTBC Genoquick®, Hain Diagnostika), et la méthode plus récente en temps réel AmplicorCOBAS TaqMan® MTB Test ;
- l'amplification transcriptionnelle associant l'action de deux enzymes d'une transcriptase inverse et d'une ARN polymérase (Amplified Mycobacterium Tuberculosis MTD® Direct Test, Gene-Probe) ;
- l'amplification par déplacement de brin (*strand displacement amplification* [SDA], Becton Dickinson) : technique complexe utilisant l'enzyme de Klenow dépourvue d'activité exonucléasique, une enzyme de restriction *Hinc*II, des désoxynucléotides dont l'un est modifié (dATP) et deux jeux d'amorces complémentaires. Cette réaction est isotherme ; la déshybridation est entretenue par une enzyme de restriction à la place de l'action de la chaleur ;
- la technique NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*) qui est une technique isotherme d'amplification d'ARN. Un ARN cible est recopié en son ADN complémentaire à l'aide d'une transcriptase inverse. Une RNase H permet l'élimination de l'ARN, puis l'ADNc est transcrit en ARN à l'aide d'une ARN polymérase. Ce processus aboutit en quelques cycles à une amplification d'environ 100 fois la quantité d'ARN présente dans l'échantillon. Cette technique est utilisée dans le coffret GenoType Direct Mycobacteria® (Hain Diagnostika).

Le test GenoQuick MTB® (Hain Diagnostika) repose sur une amplification générée par PCR spécifique et détectée qualitativement sur bandelette. En premier lieu, les amplicons simple brin s'hybrident avec les sondes spécifiques contenues dans le mélange amorces/nucléotides. Ces complexes se fixent ensuite sélectivement à la bande test et sont visualisé en 15 minutes grâce à un marquage à l'or.

Un système permettant l'automatisation complète de l'analyse (extraction ADN, préparation des mélanges réactionnels, amplification et détection des séquences cibles par PCR temps réel), du prélèvement du patient au résultat final, a été développé (Test Xpert® MTB/RIF, Cepheid). Cette méthode permet de détecter simultanément la présence du génome des mycobactéries de la tuberculose et la résistance à la rifampicine (Tableau 34.8). Les amorces amplifient une portion du gène *rpoB* de 81 paires de base et l'hybridation sélective des 5 sondes permet d'identifier les mycobactéries

Tableau 34.7 **Principe et caractéristiques des méthodes de détection moléculaire des mycobactéries à partir d'échantillons cliniques.**

Méthode	Amplicor®	AMTD®	SDA®	Genoquick MTB®	GenoType Direct Myco®	Xpert MTB/RIF®
Fabricant	Roche	Gen Probe	Becton Dickinson	Hain diagnostika	Hain diagnostika	Cepheid
Principe de détection	Fluorescence	Luminescence	Luminescence	Colorimétrie	Colorimétrie	Fluorescence
Gène cible	ADN 16S	ADN 16S	ADN 16S - IS*6110*	ADN 23S	ADN23S	*rpob*
Étape d'amplification	Point final	Point final	Temps réel	Point final	Point final	Temps réel
Type de méthode	PCR	AMTDT	SDA	?	NASBA	PCR
Temps d'exécution	6 H	6 H	2,5 H	3 H	5 H	2 H
Détection de résistance associée	–	–	–	–	–	Rifampicine
Espèces MTB* *M. avium* *M. intracellulare* *M. kansasii* *M. malmoense*	+ 	+ 	+ + 	+ 	+ + + + +	+

* Mycobactéries du complexe de la tuberculose

Tableau 34.8 **Détection moléculaire de la résistance aux antituberculeux.**

Méthode	Fabricant	Antibiotique	Gène	Nombre de sonde « sauvages »	Nombre de sondes positions mutées
INNO-LiPA Rif.TB®	Innogenetics	Rifampicine	*rpo*B	5	4
MTBDR *plus*®	Hain diagnostika	Rifampicine Isoniazide	*rpoB* *katG* *inhA*	8 1 2	4 2 4
MTBDR *sl*®	Hain diagnostika	Fluoroquinolones Aminoglycosides Ethambutol	*gyrA* *rrs* *embB*	3 2 1	6 2 2
Xpert MTB/RIF®*	Cepheid	Rifampicine	*rpo*B	5	0**

* PCR en temps réel.
** La détection de la résistance est observée par la diminution du nombre de sondes hybridées sur le produit de PCR.

du complexe *tuberculosis* et de différencier la séquence sauvage des mutations associées à la rifampicine (hybridation de 4 sondes). Les performances de ce test ont montré une sensibilité variant de 100 % (prélèvement avec microscopie et culture positives) à 71,7 % (prélèvement microscopie négative et culture positive).

Dans le cas de prélèvements pulmonaires à examen direct positif, les techniques d'amplification génique qui présentent une bonne sensibilité et une bonne spécificité sont recommandées pour distinguer les mycobactéries atypiques des mycobactéries de la tuberculose. L'utilisation des techniques d'amplification dans la surveillance d'un traitement antituberculeux n'est pas recommandée. En effet, des résultats positifs, dus à la présence de fragments de génome de bacilles morts, ont été observés alors même que les cultures et les examens directs étaient négatifs. En pratique, les techniques de détection rapide par amplification ne remplacent pas actuellement les étapes classiques et leur utilisation est recommandée pour les prélèvements présentant une microscopie positive ou provenant d'un patient présentant une forte suspicion de tuberculose.

L'avis du Haut conseil en santé publique (HCSP) relatif aux lignes directrices du diagnostic de la tuberculose à bacilles multirésistants (HCSP 16 et 18 décembre 2014) stipule que « tout nouveau patient pour lequel les prélèvements ont un résultat d'examen microscopique positif ou pour lequel l'examen microscopique est négatif mais la culture positive bénéficie de l'utilisation d'un test moléculaire confirmant qu'il s'agit bien d'une mycobactérie du complexe *tuberculosis* (PCR *M. tuberculosis complex* et d'une recherche de mutations du gène *rpoB* conférant la résistance à la rifampicine. Cette recherche peut être utilement couplée à la recherche de mutations conférant la résistance à l'isoniazide. Le résultat de ces tests doit pouvoir être disponible dans un délai maximal de 72 heures ». Les PCR en temps réel Xpert® MTB/RIF et GenoType MTBDR*plus*® sont les test les plus adaptés pour répondre à ces recommandations. Le principe du GenoType MTBDR*plus*® est l'association d'une PCR à une hybridation sur bandelette du produit d'amplification. Il permet l'identification du complexe *tuberculosis* et la détection des principales mutations responsables de la résistance à la rifampicine (*rpo*B) et à l'isoniaside (*kat*G et *inh*A). L'utilisation de ces tests ne permet pas de s'affranchir de la réalisation d'un antibiogramme.

Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Mycobactéries de la tuberculose

Les bacilles de la tuberculose (*M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum*) constituent la majorité des souches isolées dans un laboratoire de routine. L'étude de la sensibilité aux antituberculeux de première intention, méthode bien standardisée et corrélée aux résultats des études cliniques, sera détaillée dans ce paragraphe. En revanche, la détermination de la sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries atypiques n'est pas standardisée et la corrélation avec les données in vivo n'est pas bonne.

Les bacilles de la tuberculose sont naturellement résistants aux antibiotiques actifs sur la plupart des espèces rencontrées en microbiologie médicale, à l'exception des aminosides (streptomycine, amikacine), des rifamycines (rifampicine) et des fluoroquinolones. Ils sont naturellement sensibles à un certain nombre d'antibiotiques dits antituberculeux : isoniazide, pyrazinamide, éthambutol, thioamides (éthionamide et protionamide). L'activité de ces antibiotiques est inégale, certains étant bactéricides et d'autres bactériostatiques. *M. bovis* est naturellement résistant au pyrazinamide.

La résistance acquise aux antibiotiques chez *M. tuberculosis* est toujours liée à des mutations de gènes chromosomiques. Dans une population bactérienne, il existe spontanément des bactéries mutantes résistantes à chacun des antituberculeux. Cette proportion de mutants résistants pour les souches dites « sauvages » varie de $1/10^5$ pour l'isoniazide à $1/10^8$ pour la rifampicine. Au sein d'une caverne tuberculeuse qui contient 10^8 bacilles, il y a, naturellement avant traitement, 100 à 1000 bacilles résistants à l'isoniazide et un résistant à la rifampicine. La survenue de chaque mutation étant indépendante, l'association de deux antibiotiques, comme l'isoniazide et la rifampicine, empêche la sélection des mutants résistants. La proportion de mutants résistants présents dans une culture est comparée à une proportion critique (1 ou 10 % selon les antibiotiques) définie par l'étude des échecs cliniques. La réalisation d'un antibiogramme doit donc être systématique pour toute souche de mycobactéries de la tuberculose isolée initialement chez un patient et également pour toute souche isolée après 3 mois de traitement. Les antibiotiques à éprouver d'emblée sont : isoniazide, rifampicine et éthambutol. En cas de rechute ou lorsqu'il existe un risque de multirésistance, il est nécessaire d'adresser la souche à un centre de référence afin de déterminer la sensibilité aux antituberculeux de seconde ligne (thioamides, fluoroquinolones, aminosides, PAS, etc.).

Méthodes phénotypiques

Méthode des proportions en milieu solide (Canetti, Rist, Grosset) (Fig. 34.8)

La méthode de référence dite « des proportions » détermine la proportion de mutants résistants aux antibiotiques. La méthode des proportions est effectuée sur milieu de Löwenstein-Jensen ou sur milieux 7H9, 7H10. Des coffrets prêts à l'emploi (Biorad) sont disponibles. Des dilutions de la souche à étudier sont ensemencées sur des milieux témoins (sans antibiotique) et sur des milieux contenant des antibiotiques afin d'obtenir des cultures dont le nombre de colonies est comptable (Fig. 34.9). Les antituberculeux sont incorporés à des concentrations critiques (Tableau 34.9) déterminées et corrélées aux concentrations sériques obtenues chez les patients à des posologies usuelles. Pour la streptomycine, l'éthambutol et la rifampicine, une seule concentration critique existe. En ce qui concerne l'isoniazide, 4 concentrations (0,1, 0,2, 1 et 2 µg/ml) permettent de distinguer les résistances à très bas niveau (sensible à 0,2 et résistante à 0,1 µg/ml) qui doivent être considérées comme cliniquement sensibles. Les souches résistantes à 10 µg/ml ont un pouvoir infectieux diminué et une croissance plus difficile.

Une suspension est obtenue en prélevant 5 à 10 colonies, sur un milieu solide non contaminé, puis homogénéisée plusieurs fois dans un tube contenant des billes de verre et 0,5 ml d'eau distillée stérile. Cette suspension est ensuite ajustée avec de l'eau stérile à 1 mg/ml par opacimétrie à l'aide d'un étalon BCG.

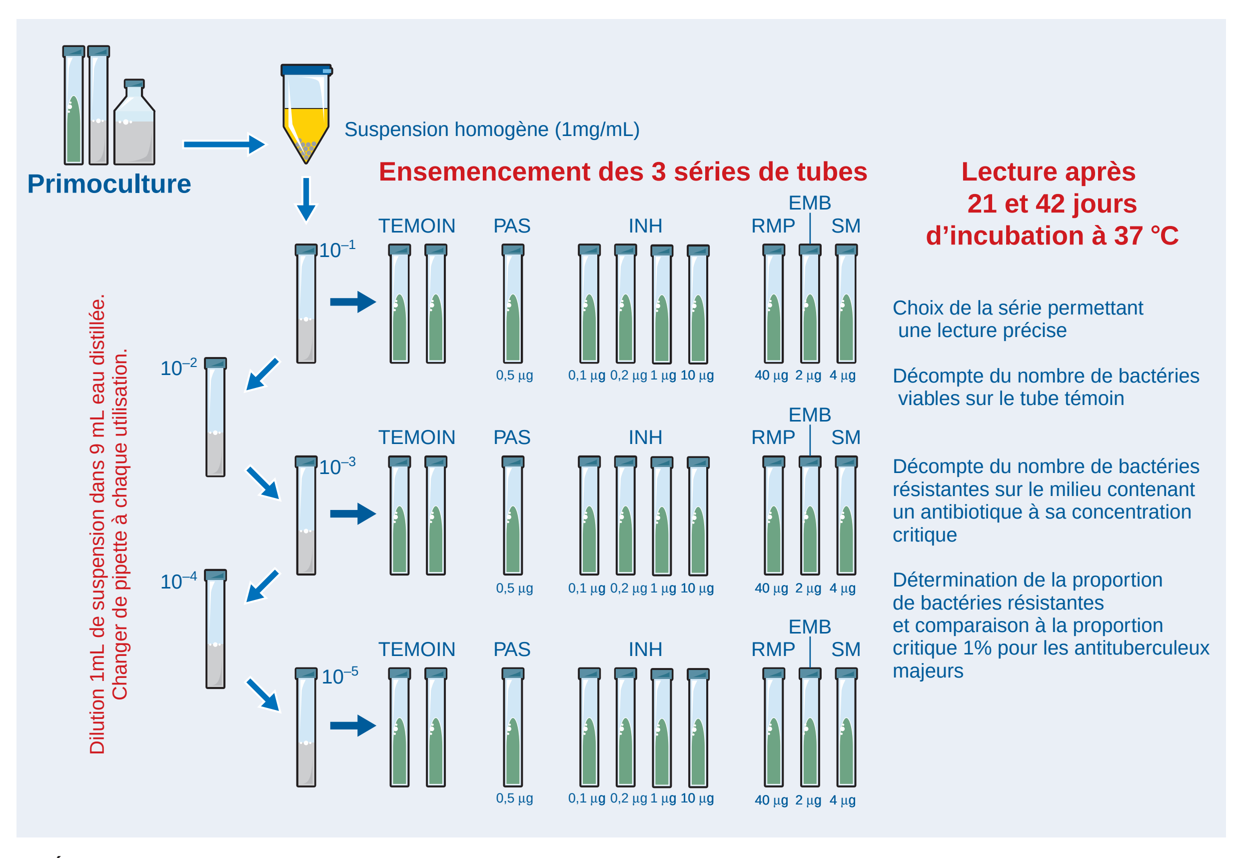


Fig. 34.8 Étude de la sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries de la tuberculose sur milieux solides (Löwenstein-Jensen) par la méthode des proportions (Canetti, Rist, Grosset).

Trois dilutions (10^{-1}, 10^{-3} et 10^{-5}) sont réalisées à partir de cette suspension calibrée et les tubes des trois séries sont ensemencés avec 0,2 ml (Fig. 34.9). Cette méthode indirecte, réalisée à partir d'une culture, peut être également effectuée directement à partir d'un prélèvement si celui-ci présente un examen direct positif (au moins 1 BAAR/champ, ×250). Les tubes sont incubés 48 heures à 37 °C avant d'être bouchés hermétiquement. Une lecture précoce est réalisée au 21e jour et la lecture définitive au 42e jour. La lecture précoce permet, notamment avec la dilution 10^{-1}, de détecter les résistances franches en comparant la culture obtenue sur les tubes témoins et les tubes contenant les antibiotiques et inversement les souches sensibles (absence de culture sur les tubes test contrastant avec la nappe visible sur les témoins sans antibiotique). Le nombre de colonies apparues sur les différents tubes est compté et permet de déduire la proportion de bacilles résistants présents dans la souche. Celle-ci est déclarée résistante lorsque la proportion des colonies résistantes est égale ou supérieure à une proportion critique (1 % pour les antituberculeux majeurs : streptomycine, isoniazide, rifampicine, éthambutol).

Bien que considéré comme un antituberculeux de première ligne, le pyrazinamide est souvent testé en seconde intention (multirésistance, rechute) en raison des performances médiocres des milieux acides utilisés : à pH acide, la croissance des mycobactéries est diminuée et peut être négative sur le témoin sans antibiotique, et inversement un milieu insuffisamment acide peut permettre à tort la croissance en présence du pyrazinamide (faux positif). La proportion critique est pour cet antituberculeux de 10 %.

Le recours à une méthode moléculaire est souvent indispensable pour détecter et caractériser cette résistance qui demeure rare chez *M. tuberculosis*.

Méthode des proportions en milieu liquide

La méthode des proportions en milieu liquide est analogue à celle réalisée en milieu solide (Fig. 34.9), mais permet de raccourcir le délai de réponse. La mesure automatisée de la croissance se fait par fluorescence (MGIT 960®) ou par colorimétrie (BacT/Alert MP®). En cas de résultats douteux, il est recommandé de déterminer la proportion exacte de mutants résistants sur milieu solide.

Par la méthode MGIT, 0,5 ml de la souche à étudier est inoculé dans les tubes contenant les antibiotiques et 0,5 ml de supplément OADC. Le tube témoin est inoculé avec 0,5 ml d'une suspension diluée au 1/100 par rapport aux tubes contenant la streptomycine (2 µg/ml), l'isoniazide (0,1 µg/ml), la rifampicine (1 µg/ml), l'éthambutol (5 µg/ml). Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 12 jours au maximum. La lecture est réalisée entre le 3e et le 12e jour en lumière UV à 365 nm. Une souche est déclarée sensible si, dans les 48 heures qui suivent la positivité (dilué au 1/100e) du témoin, aucune fluorescence n'est détectée dans les tubes contenant les antibiotiques. Si une fluorescence apparaît en même temps ou dans les 48 heures dans un des tubes contenant un antibiotique, cette souche sera considérée résistante à cet antibiotique. En ce qui concerne l'isoniazide, la détermination du niveau de résistance peut être réalisée en utilisant une concentration de 0,4 µg/ml.

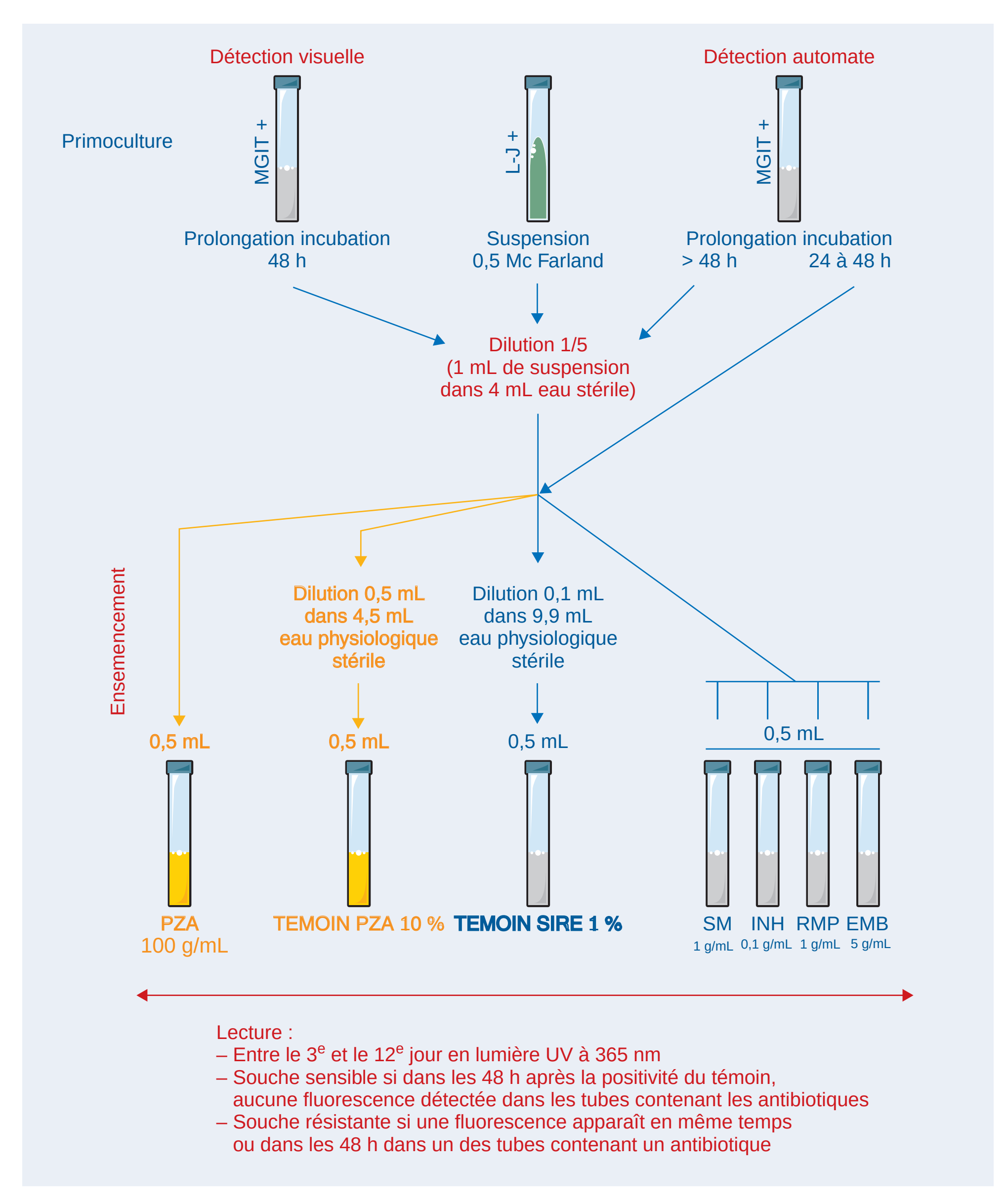


Fig. 34.9 Étude de la sensibilité aux antituberculeux en milieux liquides par la méthode MGIT® (Bactec).

Méthodes moléculaires

La résistance acquise aux antibiotiques chez *M. tuberculosis* est toujours liée à des mutations des gènes chromosomiques et n'est pas transférable d'une souche à l'autre. Il n'a pas été décrit de plasmides ou de transposons de résistance.

Les mutations responsables de la résistance aux antibiotiques peuvent être identifiées après amplification des gènes (ou fragments de gènes) sur lesquels elles sont localisées. Les mutations peuvent aussi être identifiées par hybridation avec des sondes oligonucléotidiques comme dans la technique LiPA ou *Line probe assay*. Cette méthode consiste à hybrider les fragments amplifiés avec des sondes pré-fixées sur une bandelette, principe analogue aux coffrets d'identification GenoTypeMycobacterium®, INNOLiPA Mycobacteria®. La révélation des hybrides se traduit par une réaction colorée (Fig. 34.10). Les sondes correspondent, pour 5 d'entre elles, à la séquence de l'allèle sauvage (sans mutation) et, pour les 4 autres, à la séquence des allèles résistants correspondant aux mutations les plus souvent décrites chez les souches résistantes. Actuellement, cette technique est commercialisée pour la détection de la résistance à la rifampicine, sous la forme de réactifs prêts à l'emploi (INNOLiPARifTB®, InnoGenetics). Elle permet de détecter rapidement une résistance à la rifampicine, ou de confirmer une résistance à la rifampicine observée au cours de l'antibiogramme. De plus, il est possible d'appliquer la technique directement aux prélèvements très riches en bacilles présentant une microscopie positive (Tableau 34.8). Plus récemment, deux coffrets permettent respectivement la détection des mutants résistants les plus fréquents à la rifampicine (gène *rpoB*) et à l'isoniazide (gène *katG* et *inhA*) (GenoType MTBDR*plus*®, Hain Diagnostika) et à l'éthambutol, aux aminosides et aux fluoroquinolones (GenoType MTBDR*sl*®) (Tableau 34.8). Ces tests sont fondés sur le même principe que le test

Tableau 34.9 **Caractères culturaux et biochimiques distinctifs des souches de mycobactéries scotochromogènes (groupe II) à croissance lente et des souches de mycobactéries non pigmentées à croissance lente (groupe III).**

Tests / Espèces	*M. flavescens*	*M. gordonae*	*M. scrofulaceum*	*M. szulgai**	Complexe *M. avium*	*M. genavense*	*M. haemophilum*	*M. malmoense*	Complexe *M. terrae***	*M. xenopi****
Groupe de Runyon	II	II	II	II	III	III	III	III	III	III
Croissance LJ à :										
– 30 °C – 37 °C – 42 °C	+ + V	+ + –	+ + +	+ + –	V + +	V + +	+ – –	+ + –	+ + –	V + +
Hydrolyse Tween® 80	+	+	–	V	–	–	–	+	+	–
Nitrate réductase	+	–	–	+	–	–	–	–	+	–
Arylsulfatase (14 jours)	+	–	–	+	V	–	–	–	V	+
Uréase	+	V	V	+	–	–	–	V	–	–
Phosphatase acide	–	V	–	+	–		–	–	+	–

* Photochromogène à 22 °C.
** *M. terrae, M. triviale* et *M. nonchromogenicum.*
*** Parfois scotocromogène.
LJ : Löwenstein-Jensen.

INNOLiPARifTB®. La sensibilité des tests détectant la résistance à la rifampicine est excellente (95 % des mutations sont situées sur une fragment limité du gène *rpoB*). La sensibilité du test (GenoType MTBDR*plus*®) pour la détection de la résistance à l'INH varie suivant les études de 79 à 92 %.

Mycobactéries atypiques

L'antibiogramme des mycobactéries atypiques n'est pas standardisé, excepté pour les souches de *M. kansasii,* pour lesquelles la détermination aux antituberculeux peut être effectuée. La sensibilité des mycobactéries à croissance rapide et à croissance lente (Sensititre® Myco susceptibility plate – Rapid growing et – Slow growing, ThermoScientific). Après 48 à 72 heures (croissance rapide) ou 10 à 14 jours (croissance lente) d'incubation à 37 °C, la lecture est effectuée. Cependant, seuls les résultats des antibiotiques considérés actifs in vivo pour l'espèce considérée doivent être rendus aux cliniciens.

Diagnostic immunologique rapide

Méthode directe

La détection directe d'antigènes solubles par latex ou ELISA à partir de produits pathologiques (sérum, LCR, liquide pleural, prélèvement respiratoire, urine) a montré une sensibilité et une spécificité médiocres et n'est pas en utilisée en routine.

Méthodes indirectes

Sérologie

Les inconvénients du diagnostic bactériologique classique de la tuberculose (sensibilité et spécificité de l'examen direct, lenteur des cultures) ont conduit de très nombreux auteurs à tenter la mise au point d'un sérodiagnostic. Les intérêts majeurs du sérodiagnostic de la tuberculose seraient le diagnostic et le suivi thérapeutique des formes paucibacillaires (extrapulmonaires, infantiles), de différencier un sujet faisant une tuberculose infection (contage) d'un sujet vacciné par le BCG et de distinguer une tuberculose infection d'une tuberculose maladie.

Les tests sérologiques (mise en évidence d'anticorps) développés, le plus souvent à partir d'un antigène (Ag) protéique unique plus ou moins purifié, sont peu sensibles et peu spécifiques. L'utilisation d'Ag lipidiques pariétaux (sulfolipides, lipooligosaccharrides, di-acyltréhaloses, phénolglycolipides) a permis d'augmenter la sensibilité des tests. L'utilisation de mélange d'Ag protéiques ou d'Ag lipidiques a permis également d'augmenter la sensibilité des tests sérologiques.

Différents obstacles rencontrés tenant à la faible spécificité (fréquence des contacts avec des mycobactéries commensales), à la sensibilité (manque de corrélation entre l'intensité de la réponse anticorps et le stade clinique) et à l'absence de standardisation ne laissent pas de place, actuellement, à l'utilisation en routine de la sérologie dans le diagnostic et la surveillance du traitement de la tuberculose.

Exploration de l'immunité à médiation cellulaire

La génomique comparative des différentes espèces des mycobactéries de la tuberculose (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG) a permis de déterminer des régions codant des protéines présentes uniquement chez *M. tuberculosis* qui permettent d'éviter des réactions croisées entre sujets vaccinés et sujets atteints de tuberculose. Parmi ces protéines,

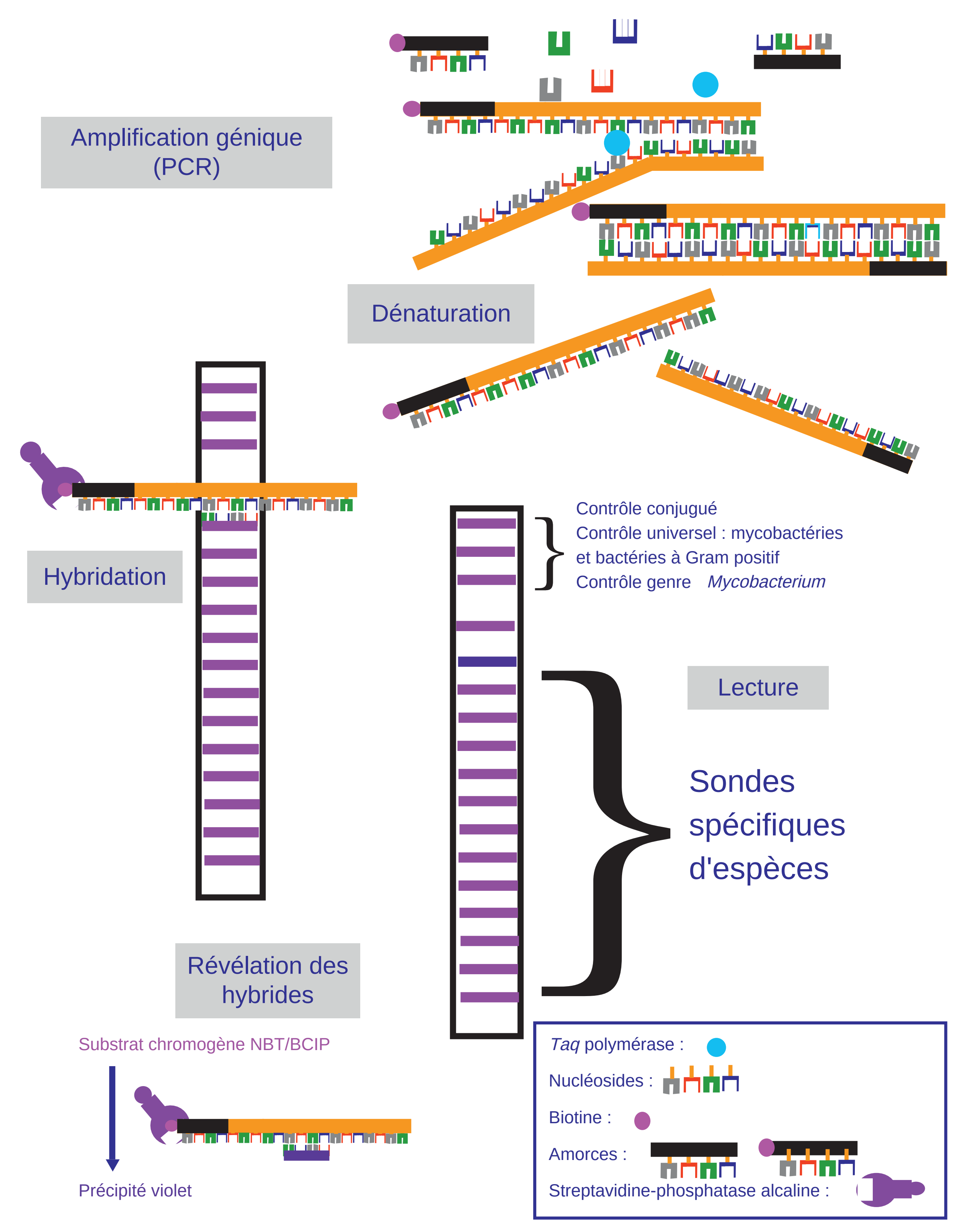


Fig. 34.10 Principe des méthodes d'identification des mycobactéries par PCR et hybridation sur support solide.

trois antigènes (ESAT6, CFP10, TB7.7) absents chez *M. bovis* BCG sont utilisés pour stimuler la production d'interféron γ (INFγ) par des cellules mononucléées du sang périphérique afin de détecter des sujets atteints de tuberculose maladie. En effet, l'activation et l'expansion des lymphocytes T spécifiques d'un antigène peuvent être induites suite à une infection ou à une immunisation (vaccin). Lorsque les lymphocytes T CD8 et CD4 sont, une seconde fois, mis en présence des antigènes, ils sécrètent de l'INFγ. Ces protéines sont également absentes de la quasi-totalité des mycobactéries atypiques, excepté quelques souches de *M. marinum, M. szulgai* et *M. kansasii*.

Deux techniques sont commercialisées pour quantifier la réponse INFγ après stimulation par ESAT6, CFP10. Le principe de la première technique (Tspot TB®, Oxford Immunotech) est de mesurer les réponses cellulaires spécifiques à ces antigènes en quantifiant le nombre de cellules T produisant de l'INFγ. En pratique, les cellules mononucléées du sang périphérique sont séparées sur gradient de Ficoll puis mises en présence de chaque Ag dans les cupules d'une microplaque sensibilisées avec des Ac anti-INFγ pendant 20 heures à 37 °C sous CO_2. Après lavage puis révélation à l'aide du système Biotine-Avidine, les « spots » colorés sont détectés à l'aide d'un lecteur. La sensibilité du test ELISPOT permet de détecter une cellule spécifique à un antigène sur 10 000 lymphocytes. Le seuil de positivité est de 10 UFS (unité formant un spot).

La seconde technique (QFT TB gold IT-TB®, Qiagen) est réalisée en prélevant sur trois tubes de sang total hépariné (tubes de sang sans Ag, avec mitogène et avec Ag [ESAT6, CFP10]). Après agitation, incubation 16 heures à 37 °C et centrifugation, le plasma est transféré dans une plaque de microtitration recouverte avec des Ac anti-INFγ. Une réaction ELISA classique quantifie la production d'INFγ en se référant à une courbe étalon. Une réponse est considérée comme positive si l'échantillon contient au moins 0,35 UI/ml. Une évolution de cette technique va être disponible prochainement ; un second tube Ag contenant un peptide impliqué dans la réponse CD8+ doit permettre d'augmenter la sensibilité du test. Ces techniques sont utilisées principalement dans le diagnostic des infections tuberculeuses latentes (ITL), mais également comme aide dans celui de la tuberculose maladie. En France, la Haute autorité de santé (HAS) a reconnu en 2006, et le HCSP en 2011, quatre indications principales :

- dans les enquêtes autour d'un cas, uniquement chez les adultes (de plus de 5 ans) ;
- lors de leur embauche, pour les professionnels de santé ;
- aide au diagnostic des formes extrapulmonaires de la tuberculose maladie difficiles à diagnostiquer ;
- avant la mise en route d'un traitement par anti-TNFα.

Le principal avantage de ces nouvelles méthodes concerne le dépistage des populations déjà vaccinées par le BCG.

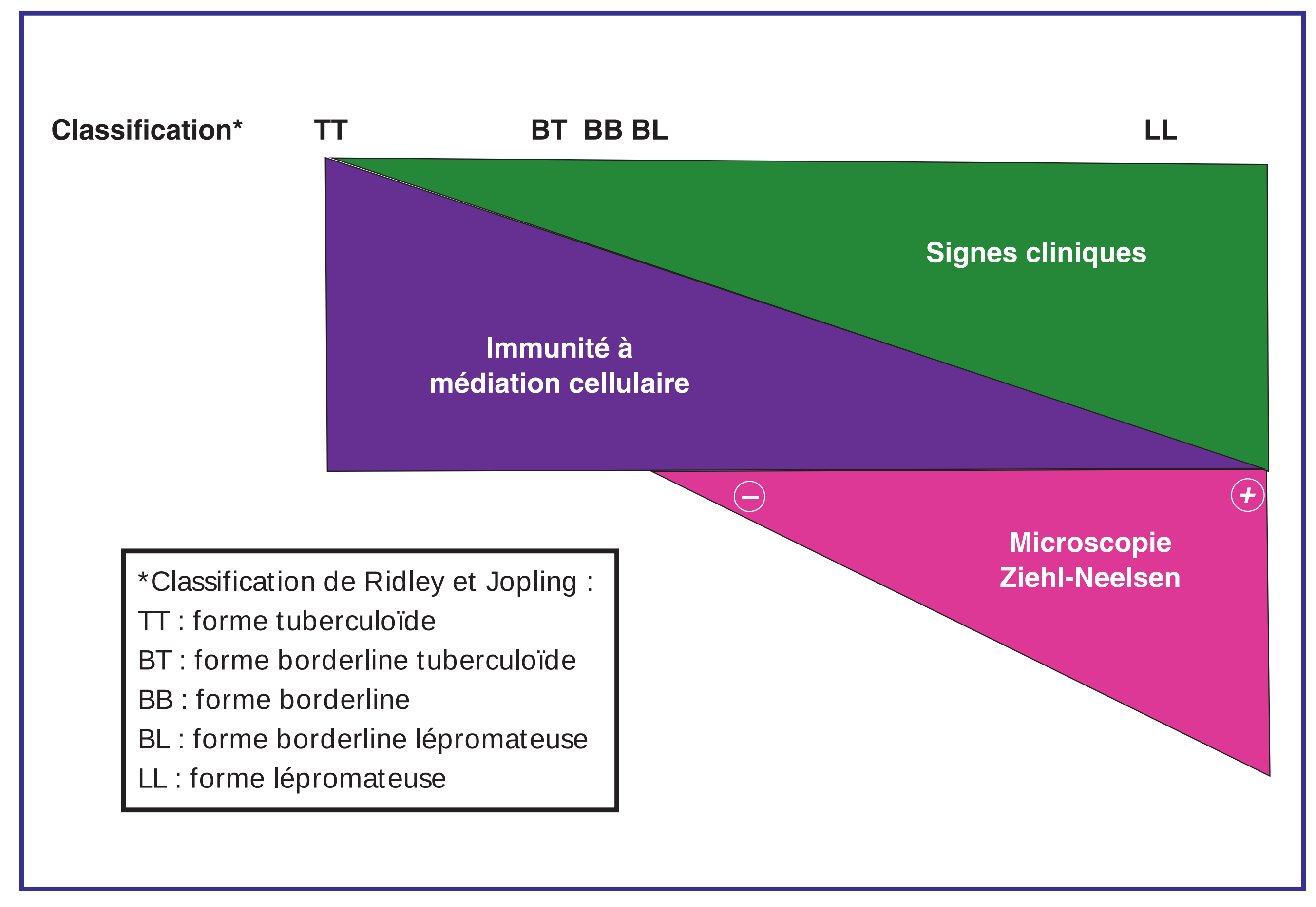


Fig. 34.11 Classification clinique et biologique de la lèpre.

Recherche du bacille de la lèpre

Bien que la mise en route d'un traitement contre la lèpre soit décidée sur des arguments cliniques (Fig. 34.11), un laboratoire métropolitain peut être amené à réaliser une confirmation de diagnostic de lèpre.

La mise en évidence du bacille de Hansen (*M. leprae*) repose sur la visualisation de la bactérie par l'examen direct (Ziehl-Neelsen) ou sur la recherche de génome par amplification génique, cette bactérie n'étant pas cultivable. La présence de BAAR regroupés en amas (globi) est observée à partir de frottis réalisés après recueil d'un raclage doux de la cloison nasale à l'aide d'un écouvillon ou d'une curette ophtalmique, d'une sérosité d'un léprome ulcéré ou d'un prélèvement de sang capillaire réalisé au lobe de l'oreille à l'aide d'un vaccinostyle.

Nous ne développerons pas le diagnostic qui sort de la routine.

Recherche de *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli)

L'ulcère de Buruli se situe au troisième rang des infections à mycobactéries chez l'homme après la tuberculose et la lèpre et connaît actuellement une recrudescence en zone tropicale. La maladie sévit en Afrique et en Australie.

L'ulcère de Buruli est une infection chronique nécrosante de la peau et des tissus mous dont les lésions siègent habituellement aux membres et surtout aux membres inférieurs. Le mode de contamination exact n'est pas connu, mais est lié à la présence de milieu aquatique avec le rôle possible de vecteurs (punaises d'eau). Outre le diagnostic clinique, le diagnostic biologique repose sur un examen histologique et un diagnostic bactériologique. Les éléments du diagnostic sont résumés dans le tableau 34.10.

Tableau 34.10 **Critères cliniques et biologiques du diagnostic de l'ulcère de Buruli (d'après H. Marchandin et al., 2004).**

Critères cliniques (suffisants pour poser le diagnostic en zone d'endémie par une personne expérimentée)	
Habitat, séjour en zone d'endémie Âge du patient Localisation de lésions Aspect des lésions	Zone intertropicale sauf Australie, Chine et Japon Enfants et adolescents de moins de 15 ans Membres (inférieurs principalement) Nodules, papules, ulcérations à bords décolés, indolores
Critères biologiques : diagnostic posé si 2 des 4 critères suivants sont positifs	
Microscopie après coloration de Ziehl-Neelsen Culture Histologie Amplification moléculaire spécifique du génome de *M. ulcerans* (IS*2404*)	Présence de BAAR, surtout en position extracellulaire Lente à 29–33 °C, scotochromogène identifié *M. ulcerans* Nécrose extensive, vascularite, BAAR Obtention d'un produit d'amplifiaction

Pour en savoir plus

Cambau E, Herrmann JL. Mycobacterium tuberculosis et autres mycobactéries. In : Rémic : Référentiel de microbiologie médicale. 5e éd. Société Française de Microbiologie ; 2015. p. 545–58.

Cambau E, Veziris N, Truffot-Pernot C. Bases microbiologiques des traitements antituberculeux – Rôle du laboratoire dans l'instauration et la surveillance du traitement. In : Denis F, Perronne C, editors. Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques. Paris : Elsevier ; 2004. p. 203–34.

Canetti G, Rist N, Grosset J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Rev Tuberc Pneumol 1963 ; 27 : 291–8.

Carbonnelle B, Dailloux M, Lebrun L, et al. Mycobactéries. Mycobactérioses Cahier de Formation Biologie Médicale 2003 ; 29.

Cattoir V. Identification moléculaire des mycobactéries et détection de la résistance aux antibiotiques. Ann Biol Clin 2004 ; 62 : 405–13.

Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis bacteriology. Organisation and practice. 2nd ed. Butterwort-Heinemann–Oxford–Boston : CRC Press ; 1997.

David H, Levy-Frebault V, Thorel MF. Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Paris : Institut Pasteur ; 1989.

Devulder G, Perriere G, Baty F, et al. BIBI, a Bioinformatics Bacterial Identification Tool (http://pbil.univ-lyon1.fr/bibi/). J Clin Microbiol 2003 ; 41 : 1785–7.

Dostal S, Richter E, Harmsen D. Concise guide to mycobacteria and their molecular differenciation. Würzburg : RIDOM Press ; 2004.

Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. on behalf of the ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee. An Official ATS/IDSA Statement : diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am Resp J Crit Care Med 2007 ; 175 : 367–416.

Leclerc MC, Thomas F, Guégan JF. Evidence for phylogenetic inheritance in pathogenicity of Mycobacterium. Antonie Van Leeuwenhoek 2003 ; 83 : 265–74.

Marchandin H, Poertals F, Van de Perre F. Mycobacterium ulcerans, agent de l'ulcère de Buruli. In : Martin C, Denis F, Perronne C, editors. Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques. Paris : Elsevier ; 2004. p. 99–115.

Martin C, Vincent V, Denis F. Diagnostic des infections à mycobactéries. In : Martin C, Denis F, Perronne C (Eds). Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques. p. 139–87.

Parrish NM, Carroll KC. The role of the clinical mycobacteriology laboratory in the diagnosis and management of tuberculosis in low prevalence settings. J Clin Microbiol 2011 ; 49(3) : 772–6.

Pfyffer GE. Mycobacterium : general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. In : Murray PR, Jo Baron H, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC : ASM Press ; 2009. p. 543–72.

Tuberculose à bacilles résistants diagnostic et prise en charge. Tuberculose multirésistante et place des tests de biologie moléculaire. Lignes directrices. Collection/Avis et Rapports. Haut Conseil en Santé Publique, 16 et 18 décembre 2014.

Tuberculose et tests de détection de l'interféron γ. Lignes directrices. Collection/Avis et Rapports. Haut Conseil en Santé Publique, 1 juillet 2011.

Vincent V, Gutiérrez C. Mycobacterium : Laboratory characteristics of slowly growing mycobacteria. In : Murray PR, Jo Baron H, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington DC : ASM Press ; 2009. p. 573–88.

www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html.

Adresse utile

Centre national de référence de la résistance des mycobactéries aux antituberculeux

Groupe Pitié-Salpêtrière, service de bactériologie-hygiène
47, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris cedex 13
Tél. : 01 42 16 20 81 et 01 42 16 20 83 – Fax : 01 42 16 20 72

Chapitre 35

Mycoplasmes

S. Pereyre, C.M. Bébéar, C. Bébéar

PLAN DU CHAPITRE

Généralités

Micro-organismes ubiquitaires, les mycoplasmes appartiennent à la classe des *Mollicutes* (de *mollis cutis* : peau molle). Ils sont dépourvus de paroi, d'où un aspect polymorphe et une insensibilité totale aux β-lactamines. Ce sont les plus petits procaryotes capables de multiplication autonome.

La classe des *Mollicutes,* comprend quatre ordres, les *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales* et *Anaeroplasmatales*, séparés d'après leur habitat naturel, leur exigence en stérols et un certain nombre d'autres propriétés. Parmi les 18 espèces rencontrées chez l'homme (Tableau 35.1), 14 appartiennent au genre *Mycoplasma*, deux au genre *Ureaplasma* (*Ureaplasma urealyticum* et *U. parvum* regroupés sous le terme *Ureaplasma* spp.) et deux au genre *Acholeplasma*. Le terme mycoplasmes continue à être utilisé pour désigner l'ensemble des *Mollicutes.*

Les mycoplasmes seraient sur le plan phylogénétique des formes très évoluées, dérivées de bactéries à Gram positif à faible teneur en guanine + cytosine, ayant des ancêtres communs avec certains *Clostridia* (*Clostridium innocuum* et *C. ramosum*) et ayant perdu la capacité de synthétiser une paroi.

Ce sont des contaminants fréquents de cultures cellulaires.

Tableau 35.1 **Mycoplasmes isolés chez l'homme.**

	Site primaire d'isolement	Pouvoir pathogène	Fermentation glucose	Hydrolyse arginine	Hydrolyse urée
M. pneumoniae	Respiratoire	+	+	–	–
M. hominis	Génital	+	–	+	–
M. genitalium	Génital	+	+	–	–
M. amphoriforme	Respiratoire	?	+	–	–
M. fermentans	Génital	?	+	+	–
M. penetrans	Génital	?	+	+	–
M. salivarium	Respiratoire	–	–	+	–
M. orale	Respiratoire	–	–	+	–
M. buccale	Respiratoire	–	–	+	–
M. faucium	Respiratoire	–	–	+	–
M. lipophilum	Respiratoire	–	–	+	–
M. primatum	Respiratoire	–	–	+	–
M. spermatophilum	Génital	?	–	–	–
M. pirum	?	?	+	+	–
Ureaplasma spp.[1]	Génital	+	–	–	+
A. laidlawii	Respiratoire	–	+	–	–
A. oculi	?	–	+	–	–

[1] Renferme deux espèces, ***U. urealyticum*** (ancien biovar 2) et ***U. parvum*** (ancien biovar 1).

Pouvoir pathogène et habitat

Largement répandus dans la nature, les mycoplasmes colonisent chez l'homme les muqueuses respiratoires et les muqueuses génitales. Seules certaines espèces sont pathogènes. Présentant une forte affinité pour les cellules, ce sont des intracellulaires facultatifs.

Infections respiratoires

Seul *Mycoplasma pneumoniae* a un pouvoir pathogène certain et n'appartient pas à la flore commensale des voies respiratoires. Le rôle de *M. amphoriforme*, espèce nouvelle trouvée dans les voies respiratoires basses de sujets immunodéprimés atteints de bronchite chronique, est à préciser.

M. pneumoniae atteint l'ensemble des voies respiratoires, dans tous les groupes d'âge, de manière endémique et épidémique. Une poussée épidémique, observée en Europe du Nord, en Israël et en Asie, a touché la France en 2010–2011. Le plus souvent responsable de trachéobronchites, *M. pneumoniae* est la deuxième cause de pneumonies communautaires derrière *Streptococcus pneumoniae*. Il serait responsable de 30 % des pneumonies communautaires pédiatriques, taux atteignant plus de 50 % chez l'enfant de plus de 5 ans. Néanmoins, la fréquence réelle est mal connue en l'absence habituelle de diagnostic étiologique dans les cas bénins. La présence d'atteintes associées, en particulier cutanées, est évocatrice. C'est une cause émergente d'encéphalite aiguë, plus spécialement chez l'enfant de moins de 10 ans. Propriétés d'adhésion, production d'une toxine cytotoxique impliquée dans la réponse inflammatoire de l'hôte, la toxine CARDS (*community acquired respiratory distress syndrome*) et mécanismes immunopathologiques interviennent dans son pouvoir pathogène.

L'implication de *M. pneumoniae* dans l'asthme (exacerbations aiguës chez l'enfant et chez l'adulte, asthme chronique stable) n'est pas clairement établie.

Infections génitales

Quatre espèces sont concernées, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* et *U. urealyticum* (Tableau 35.2). La présence de *M. hominis* et surtout d'*Ureaplasma* spp. à l'état commensal dans les voies génitales basses rend délicate l'appréciation de leur pouvoir pathogène. La fréquence de colonisation varie avec l'âge, les facteurs hormonaux, l'origine ethnique, le niveau socio-économique et l'activité sexuelle. Elle peut atteindre près de 30 % au niveau vaginal pour *Ureaplasma* spp., mais reste inférieure à 10 % pour *M. hominis*. *M. genitalium* peut être retrouvé dans les voies génitales de patients asymptomatiques mais son caractère commensal n'est pas établi.

M. genitalium et *Ureaplasma* spp. sont des agents d'urétrites non gonococciques (UNG) non chlamydiennes, aiguës et chroniques. *M. genitalium* est le deuxième agent d'UNG (environ 25 % des cas), derrière *Chlamydia trachomatis*. Ils provoquent des arthrites réactionnelles.

Chez la femme, le rôle des mycoplasmes est plus complexe (Tableau 35.2) et peut se manifester à différents niveaux du tractus génital. *M. genitalium* est le seul mycoplasme responsable de cervicites. *M. hominis* et *M. genitalium* sont impliqués dans les endométrites et les salpingites.

Ureaplasma spp. et *M. hominis* sont mis en cause dans des troubles de la reproduction (infections du post-partum, chorioamniotites), et prématurité et petit poids de naissance pour *Ureaplasma* spp. Des atteintes néonatales à type de pneumonies, de bactériémies et de méningites sont associées à ces deux espèces.

Une récente méta-analyse retrouve que l'infection à *M. genitalium* est associée à un risque deux fois plus élevé de prématurité ou d'avortement spontané.

Infections systémiques

Les mycoplasmes, surtout *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*, doivent être recherchés lors d'infections chez des immunodéprimés (arthrites septiques chez les hypogammaglobulinémiques, plaies sternales avec médiastinites après chirurgie thoracique, bactériémies, ostéomyélites, abcès rétropéritonéaux, surinfections d'hématomes). Habituellement de découverte fortuite, l'espèce en cause est le plus souvent, en dehors des arthrites, *M. hominis* qui pousse sur gélose au sang.

Caractères généraux

De très petite taille, 300–850 nm, les mycoplasmes rencontrés chez l'homme sont polymorphes, coccoïdes ou filamenteux et ne sont pas colorables par le Gram.

Anaérobies facultatifs, ils exigent des milieux complexes, renfermant des stérols (à l'exception des *Acholeplasma*). Ils utilisent comme source principale d'énergie le métabolisme du glucose ou de l'arginine (genre *Mycoplasma* et *Acholeplasma*) ou de l'urée (genre *Ureaplasma*).

Leur croissance, relativement aisée pour *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* (environ 48 heures), est difficile et lente pour *M. pneumoniae* (6 à 20 jours) et encore davantage pour *M. genitalium*, espèce extrêmement fastidieuse et exceptionnellement cultivée à partir d'échantillons cliniques. Leur croissance en milieu liquide se traduit par le virage d'un indicateur coloré. Sur gélose, ils donnent de petites colonies (50 à 300 μm) visibles à la loupe binoculaire, prenant pour certains un aspect en œuf sur le plat, en raison de la pénétration des mycoplasmes dans la gélose (Fig. 35.1, 35.2 et 35.3).

La séquence du génome est connue pour toutes les espèces pathogènes pour l'homme. *M. genitalium* a le plus petit génome bactérien connu (580 kpb).

M. pneumoniae et *M. genitalium* ont des communautés antigéniques et génétiques.

Diagnostic bactériologique direct

Le diagnostic direct est utilisable pour toutes les espèces mais avec des méthodes différentes. Culture et identification métabolique sont recommandées pour *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* à partir de prélèvements urogénitaux. Pour ces

Tableau 35.2 **Importance de l'association des mycoplasmes génitaux dans différents tableaux cliniques.**

Pathologie	*M. hominis*	*Ureaplasma* spp.[1]	*M. genitalium*
Infections génitales masculines			
– Urétrite non gonococcique	–	+	+
– Épididymites, prostatites	–	±	±
– Infertilité	–	±	–
Infections gynécologiques			
– Vaginose bactérienne	±	–	–
– Cervicites	–	–	+
– Endométrites	+	+	+
– Salpingites	+	–	+
Troubles de la reproduction			
– Chorioamniotites	+	+	–
– Fièvres, endométrites postpartum	+	+	–
– Avortement spontané	±	±	–
– Retard de croissance intra-utérin	–	±	–
Atteintes néonatales			
– Prématurité – Faible poids de naissance	–	+	–
– Infections respiratoires, neurologiques, bactériémies, abcès	+	+	–
– Maladie pulmonaire chronique	–	±	–
Infections extragénitales			
– Arthrites septiques	+	+	+
– Arthrites réactionnelles	–	+	+
– Pyélonéphrites	+	–	–
Autres localisations (surinfection de plaies sternales, abcès rétropéritonéaux, abcès du cerveau, septicémies, etc.)	+	+	–

+ : Association certaine, rôle causal démontré ; ± : association significative mais rôle causal non démontré ; – : pas d'association.
[1] Comprend deux espèces, ***U. urealyticum*** et ***U. parvum.***
(Adapté d'après Bébéar C, Bébéar CM. Infections humaines à mycoplasmes. RFL 2007 ; 391 : 63–9.)

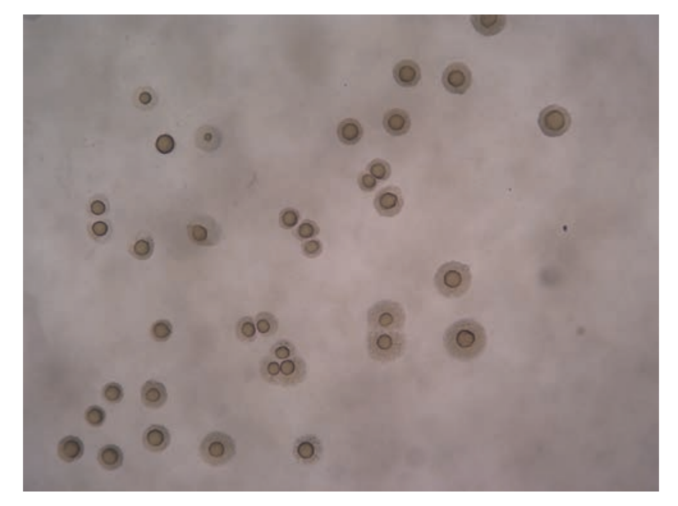


Fig. 35.1 **Colonies de *M. hominis*.** *(H. Renaudin.)*

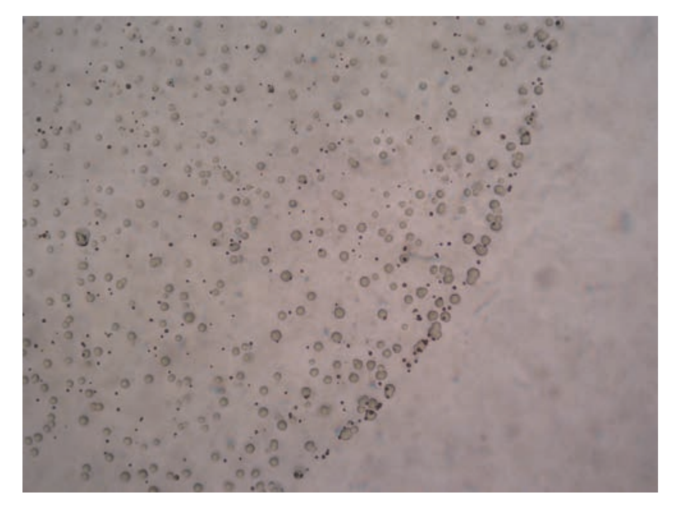


Fig. 35.2 **Colonies d'*Ureaplasma* spp.** *(H. Renaudin.)*



Fig. 35.3 **Mélange *M. hominis* et *Ureaplasma* spp. (ensemencement en touche).** *(H. Renaudin.)*

espèces, les méthodes moléculaires n'ont d'intérêt qu'à partir d'échantillons où ils sont difficiles à mettre en évidence.

La culture est rarement réalisée pour *M. pneumoniae* en raison des délais nécessaires et de sa faible sensibilité. Elle est avantageusement remplacée par l'amplification d'acides nucléiques. Cette dernière est la seule utilisable en pratique pour *M. genitalium*.

Prélèvements

Prélèvements de gorge et aspirations nasopharyngées chez le jeune enfant sont à préférer pour la recherche de *M. pneumoniae* en raison du caractère diffus de l'infection. Brossage bronchique et lavage bronchoalvéolaire sont également adaptés, contrairement aux expectorations, trop contaminées. Pour la culture, les prélèvements sur écouvillon seront mis en milieu de transport (milieu de transport universel (*universal transport medium* [UTM®]) ou milieu 2SP, saccharose phosphate, contenant 5 % de sérum de veau fœtal mais pas d'antibiotique). Les prélèvements liquidiens sont ensemencés sans centrifugation. Les milieux peuvent être conservés à +4 °C pendant 48 heures et au-delà à –80 °C.

Les mycoplasmes génitaux peuvent être recherchés à partir de : prélèvements urétraux, premier jet d'urine, plus rarement sperme et sécrétions prostatiques, prélèvements vaginaux, cervicovaginaux, endométriaux, biopsies, brossage tubaire, liquide amniotique, placenta, prélèvements endotrachéaux chez le nouveau né. Ces prélèvements sont placés dans les milieux de transport cités précédemment, et conservés à +4 °C ou à –80 °C.

En cas de PCR pour *M. pneumoniae* et *M. genitalium*, il n'est pas nécessaire d'utiliser des milieux de transport.

D'autres échantillons peuvent être étudiés. Les milieux pour hémocultures sont peu adaptés à la recherche de mycoplasmes en raison de la présence d'anticoagulants inhibiteurs.

Milieux de culture

Les milieux utilisés sont complexes. Ils renferment 20 % de sérum, de l'extrait de levure et sont rendus sélectifs par addition d'une β-lactamine et éventuellement d'autres inhibiteurs (Encadré 35.1). Il faut utiliser des milieux liquides et gélosés. Les milieux liquides sont ensemencés en réalisant

Encadré 35.1 Composition des milieux de culture pour mycoplasmes

Milieu sP-4

- Base
  - Base bouillon *Mycoplasma* : 3,5 g
  - Tryptone: 10 g
  - Peptone : 5,3 g
  - Glucose : 5 g
- Suppléments stériles
  - Milieu CMRL 1066 sans (10 ×) sans glutamine sans $NaHCO_3$: 50 ml
  - Glutamine (100 ×) : 5 ml
  - $NaHCO_3$: 2,2 g
  - Extrait de levure : 5 g
  - Extrait aqueux de levure (solution 2 %) : 100 ml
  - Sérum de veau fœtal : 170 ml
  - Ampicilline : 0,5 g
  - Colimycine : 250 000 UI
  - Amphotéricine B : 5 mg
  - Rouge de phénol (1 mg/ml) : 20 ml
  - Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
  - pH : 7,6

Milieu de Hayflick modifié

- Bouillon d'infusion de cœur : 17,5 g
- Extrait de levure : 5 g
- Sérum de poulain : 200 ml
- Arginine ou glucose : 5 g
- Rouge de phénol (1 mg/ml) : 20 ml
- Ampicilline : 0,5 g
- Colimycine : 250 000 UI
- Amphotéricine B : 5 mg
- Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
- pH : 7,4 pour milieux glucosés, 7,0 pour milieux avec arginine.

La composition du milieu gélosé est la même, sauf : absence d'arginine, glucose, rouge de phénol et présence d'agar purifié (10 g).

Milieu de Shepard

- Trypticase soja : 24 g
- Extrait de levure : 5 g
- Sérum de poulain : 200 ml
- Cystéine : 100 mg
- Urée : 600 mg
- Rouge de phénol (1 mg/ml) : 20 ml
- Ampicilline : 0,5 g
- Colimycine : 250 000 UI
- Amphotéricine B : 5 mg
- Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
- pH : 6

La composition du milieu gélosé est la même sauf : absence de rouge de phénol, présence de sulfate de manganèse (150 mg), de putrescine (1,5 g) et d'agar purifié (10 g).

des dilutions (10^{-1} à 10^{-4}) pour éliminer des inhibiteurs tissulaires et faire une étude semi-quantitative. Les milieux gélosés sont ensemencés en touche. L'incubation a lieu à 37 °C, de préférence sous CO_2.

Pour *M. pneumoniae*, milieu de Hayflick modifié et milieu SP-4 peuvent être utilisés. Les milieux liquides renferment glucose et rouge de phénol. La croissance se traduit par une acidification du milieu après 6 à 20 jours. Sur milieu gélosé, les colonies sont petites, granulaires.

Ureaplasma spp. et *M. hominis* poussent sur milieu de Shepard à pH 6. Le milieu renferme de l'urée utilisée par *Ureaplasma* spp. et du rouge de phénol. Milieu de Hayflick modifié et milieu SP-4 contenant de l'arginine conviennent à *M. hominis* mais pas à *Ureaplasma* spp. La croissance de *Ureaplasma* spp. sur milieu liquide renfermant de l'urée se traduit par une alcalinisation en 18 à 24 heures. La croissance de *M. hominis* se traduit par une alcalinisation des milieux à l'arginine en 48 heures. Une appréciation quantitative de la croissance permet de déterminer un nombre d'unités de changement de couleur (UCC)/ml. Sur milieu gélosé, les colonies d'*Ureaplasma* spp. sont irrégulières, très petites, brunes en présence de sulfate de manganèse, à ne pas confondre avec des cristallisations dans la gélose, et apparaissent en 48 à 96 heures. *M. hominis* donne en 48 à 96 heures des colonies en œuf sur le plat (voir Fig. 35.1 à 35.3).

La croissance en milieu liquide doit toujours être contrôlée sur milieu gélosé pour éviter une confusion avec un virage d'indicateur coloré dû à la présence d'autres bactéries ou de cellules.

Pour les espèces très fastidieuses, *M. genitalium* et *M. amphoriforme*, le milieu SP-4 enrichi en glucose est le plus adapté. Un passage en culture de cellules peut aider à la croissance de *M. genitalium*. Celle-ci reste exceptionnelle.

Identification d'espèce

Selon les cas, l'identification d'espèce se fait sur les propriétés métaboliques, l'aspect des colonies ou l'amplification d'acides nucléiques.

Pour *M. pneumoniae*, les propriétés métaboliques et les propriétés d'hémadsorption ou d'hémagglutination ne sont plus utilisées. Les tests d'amplification d'acides nucléiques permettent de l'identifier et de le séparer de *M. genitalium* et de *M. amphoriforme*.

L'identification d'*Ureaplasma* spp. (hydrolyse de l'urée) et de *M. hominis* (hydrolyse de l'arginine) est simple. La séparation des deux espèces, *U. urealyticum* et *U. parvum*, réalisable par PCR, n'est pas faite en pratique courante. La technique de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF permet d'identifier les espèces de mycoplasmes humains à partir des milieux de culture et d'identifier les deux types de l'adhésine P1 chez *M. pneumoniae*.

Kits

Différents kits destinés à la détection et à l'appréciation quantitative d'*Ureaplasma* spp. et de *M. hominis* à partir de prélèvements urogénitaux sont disponibles.

Ces systèmes correspondent en général à des microplaques unitaires avec des cupules contenant des substrats lyophilisés et des inhibiteurs spécifiques des deux espèces. Les échantillons sont placés dans un milieu de suspension qui sert lui-même à ensemencer les cupules. La détection, l'identification et la numération des mycoplasmes sont fondées sur le changement de couleur des cupules témoignant de la croissance du mycoplasme en présence de substrat ou d'inhibiteur spécifiques. Certains systèmes permettent de déterminer, dans un même temps, la sensibilité de la souche de mycoplasme détectée aux antibiotiques.

Ces kits donnent globalement des résultats comparables aux méthodes standard de culture en milieu liquide ou gélosé, les rendant attractifs pour les laboratoires ne réalisant qu'occasionnellement le diagnostic des mycoplasmes urogénitaux. Des faux positifs sont décrits en cas de contamination du prélèvement par d'autres bactéries, conduisant à recommander, en cas de doute, la vérification de l'identification du mycoplasme par culture en milieu gélosé.

Tests d'amplification d'acides nucléiques

Ces tests remplacent la culture pour *M. pneumoniae*. Plusieurs protocoles de PCR ciblant le gène de l'adhésine P1, de l'ARNr 16S, de la toxine CARDS, sont disponibles. De nombreux kits de PCR en point final ou en temps réel, multiplex ou non, de *loop-mediated isothermal DNA amplification* (LAMP) sont commercialisés. La PCR peut être réalisée sur les différents prélèvements déjà cités, en particulier les écouvillonnages de gorge et les aspirations nasopharyngées.

La PCR est la seule méthode permettant en pratique la détection de *M. genitalium*. Des kits de PCR en temps réel monoplex ou multiplex, de *transcription-mediated amplification* (TMA) sont maintenant commercialisés.

Pour *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*, des trousses commercialisées monoplex ou multiplex sont aussi disponibles et présentent un intérêt pour les prélèvements utéro-annexiels effectués lors des infections génitales hautes ou pour des prélèvements extragénitaux.

Typage moléculaire

C'est pour *M. pneumoniae* que les méthodes moléculaires se sont le plus développées pour mieux comprendre l'épidémiologie des infections et pour caractériser les épidémies dues à ce micro-organisme. *M. pneumoniae* est une espèce génétiquement homogène. Les méthodes de typage les plus courantes ont longtemps été fondées sur l'analyse des polymorphismes nucléotidiques (*single nucleotidic polymorphism* [SNP]) dans le gène codant pour la protéine immunogène majeure, l'adhésine P1. Il existe deux types principaux de *M. pneumoniae* (types 1 et 2) avec quelques variants au sein de chaque type. De nouvelles méthodes de génotypage ont été récemment mises au point, étudiant plusieurs parties du génome ou le génome dans sa totalité, comme la *multiple locus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA) ou le *multi-locus sequence typing* (MLST). Ces méthodes sont beaucoup plus discriminantes et ont démontré leur intérêt dans l'étude d'épidémies à *M. pneumoniae* ; certaines peuvent être effectuées directement sur des échantillons respiratoires ou sont automatisables. Le typage par MLVA permet, par exemple, de séparer plus de 50 génotypes différents.

L'analyse des SNP du gène codant l'adhésine majeure de *M. genitalium*, MgPa, est également réalisable et permet

d'identifier un grand nombre de génotypes différents. Elle a été utilisée pour l'épidémiologie de la transmission de cette espèce entre partenaires sexuels. *M. hominis* et *Ureaplasma* spp. sont des espèces plus hétérogènes pour lesquelles quelques méthodes de typage moléculaire ont été développées.

Interprétation

M. pneumoniae n'appartenant pas à la flore commensale, sa présence dans un échantillon respiratoire ou une autre localisation est un élément significatif.

La mise en évidence dans les voies génitales basses d'*Ureaplasma* spp. surtout et, à un moindre degré, de *M. hominis* est plus difficile à interpréter en raison de leur existence possible à l'état commensal. Une appréciation quantitative est proposée. Pour *Ureaplasma* spp. au cours d'une UNG, une valeur ≥ 10^4 UCC/ml dans un prélèvement urétral et ≥ 10^3 UCC/ml pour un premier jet d'urines est significative. La présence d'*Ureaplasma* spp. dans un prélèvement cervicovaginal est très difficile à interpréter. Celle de *M. hominis* en quantité ≥ 10^4 UCC/ml est plus significative et peut évoquer un tableau de vaginose bactérienne ou une infection génitale haute. Leur isolement dans un échantillon normalement stérile doit les faire considérer comme pathogènes. Chez le nouveau-né, la présence dans un prélèvement endotrachéal à un taux ≥ 10^4 UCC/ml est significative dans un contexte clinique évocateur d'une infection chez un nouveau-né le plus souvent prématuré et hypotrophe.

La mise en évidence de *M. genitalium* dans les UNG, cervicites ou prélèvements des voies génitales hautes doit le faire considérer comme pathogène et amener à le traiter.

La recherche de mycoplasmes ne doit pas être faite de façon isolée, mais être associée à la recherche d'autres pathogènes tels que *C. trachomatis et Neisseria gonorrhoeae* pour les infections génitales.

Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Antibiotiques actifs, résistance naturelle

En raison de leur structure particulière, tous les mycoplasmes résistent aux β-lactamines et à tous les antibiotiques agissant sur la biosynthèse du peptidoglycane. Ils résistent également aux polymyxines, sulfamides, triméthoprime, acide nalidixique, rifampicine et linézolide.

Les antibiotiques actifs, utilisables en thérapeutique humaine, sont les tétracyclines, les macrolides-lincosamides-streptogramines-kétolides (MLSK) et les fluoroquinolones (Tableau 35.3). Les fluoroquinolones et les kétolides ont un effet bactéricide in vitro sur les mycoplasmes.

Il existe cependant une résistance naturelle aux MLSK, spécifique à certaines espèces. *M. pneumoniae* et *M. genitalium* sont sensibles aux MLSK, excepté à la lincomycine. *Ureaplasma* spp. est sensible aux MSK mais résiste aux lincosamides. À l'inverse, *M. hominis* résiste aux macrolides ayant un cycle à 14 et 15 chaînons et à la télithromycine ; il est sensible aux lincosamides et à certains macrolides à 16 chaînons (josamycine et midécamycine), mais non à la spiramycine.

Résistance acquise

La résistance acquise est due à l'existence de mutations ou à la présence de transposons, et est associée à des modifications de la cible des antibiotiques.

Surtout fréquente chez les mycoplasmes génitaux, *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*, elle concerne en premier lieu les tétracyclines et est due à la présence du déterminant *tet(M)*. Elle concerne à Bordeaux environ 15 % des souches cliniques de *M. hominis* et moins de 5 % de *Ureaplasma* spp. Les résistances acquises aux fluoroquinolones et aux macrolides sont beaucoup plus rares chez ces espèces et sont observées chez des sujets immunodéprimés ayant reçu de nombreux traitements antibiotiques.

Très peu de souches cliniques de *M. pneumoniae* résistantes aux macrolides ont été décrites avant 2000. Elles ont émergé dans le monde et concernent aujourd'hui plus de 80 % des souches au Japon et pratiquement toutes les souches en Chine, chez l'enfant et l'adulte. Cette résistance atteint l'Amérique du Nord et l'Europe avec des prévalences de résistance inférieures à 15 %. Huit pour cent des souches étudiées en France lors de l'épidémie de 2011 étaient résistantes aux macrolides. Liée à des mutations de la cible ribosomique ARNr 23S, il s'agit d'une résistance de type MLS_B avec une augmentation des CMI variable selon la mutation en cause. Les résistances s'accompagnent d'échecs thérapeutiques. Il n'a pas été observé à ce jour de résistance aux tétracyclines ou aux fluoroquinolones chez les souches cliniques de *M. pneumoniae*.

Tableau 35.3 **Profils de sensibilité et de résistance naturelle des mycoplasmes aux antibiotiques.**

	Érythromycine[a]	Clindamycine	Pristinamycine[b]	Tétracycline[c]	Lévofloxacine Moxifloxacine[d]
M. pneumoniae, M. genitalium[e]	S	S	S	S	S
M. hominis	R	S	S	S	S
Ureaplasma spp.	S	R	S	S	S

[a] La sensibilité à l'érythromycine répond pour celle à l'azithromycine.
[b] La pristinamycine n'a pas été évaluée dans les recommandations du CLSI.
[c] La sensibilité à la tétracycline répond pour celle à la doxycycline.
[d] Les autres fluoroquinolones n'ont pas été évaluées par le CLSI.
[e] *M. genitalium* n'a pas été évalué par le CLSI.
(Adapté d'après Waites KB, Bade DJ, Bébéar CM, et al. Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas : Approved guideline. Wayne (PA) : Clinical and Laboratory Standards Institute. Document M43-P.)

La résistance acquise aux macrolides est en augmentation chez *M. genitalium*, entraînant des échecs thérapeutiques sous azithromycine, un des traitements de première intention des UNG et cervicites. Elle concerne près de 40 % des souches au Danemark, en Australie et au Royaume-Uni, et 10 à 15 % des souches en France. La moxifloxacine est active en cas de résistance aux macrolides, bien que quelques cas d'échecs thérapeutiques à cette fluoroquinolone aient été décrits récemment dans la littérature.

Méthodes d'étude

La sensibilité des mycoplasmes génitaux, *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*, doit être étudiée chaque fois qu'ils sont en situation pathogène ou dès qu'ils sont isolés de sites extragénitaux, a fortiori chez des sujets immunodéprimés.

Les CMI peuvent être déterminées par dilution en milieu liquide ou gélosé adapté à l'espèce. L'antibiogramme par diffusion par la méthode des disques n'est pas utilisable, mais le E-test® a été adapté principalement à *M. hominis*.

Des recommandations concernant les méthodes d'étude de la sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes humains ont été publiées en 2011 par le Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

Plusieurs kits étudiant la sensibilité aux antibiotiques de *M. hominis* et d'*Ureaplasma* spp. sont disponibles seuls ou complétant un kit de détection et d'identification de ces espèces. Leur principe repose sur l'inhibition métabolique de la croissance des mycoplasmes. Ils consistent en des rangées de puits contenant des antibiotiques lyophilisés à une ou deux concentrations, correspondant aux concentrations critiques utilisées pour classer les bactéries en sensibles, intermédiaires ou résistantes à l'antibiotique testé. Les résultats obtenus sont satisfaisants, à la condition d'utiliser un inoculum contrôlé, le plus souvent après une primoculture. Certains de ces kits ont été adaptés aux recommandations du CLSI.

Devant l'augmentation de fréquence de la résistance aux macrolides chez *M pneumoniae* et *M. genitalium*, une surveillance épidémiologique est nécessaire. Elle peut se faire par PCR en temps réel ou pyroséquencage, recherchant les mutations associées à la résistance aux macrolides directement à partir des échantillons cliniques. Ces méthodes moléculaires permettent également d'adapter plus rapidement le traitement antibiotique.

Sérologies

Ce sont les méthodes les plus utilisées pour le diagnostic d'infection à *M. pneumoniae* en France. La présence d'agglutinines froides n'est ni constante ni spécifique. La réaction de fixation du complément détecte IgG et IgM. Bien que peu sensible, c'est un critère d'appréciation toujours valable, à condition d'avoir une séroconversion ou un taux minimal présomptif de 64. Parmi les autres techniques disponibles, les techniques ELISA sont les plus employées, généralement plus sensibles et plus spécifiques que les autres techniques. Cependant, le titre-seuil est variable selon les trousses et toutes les trousses ne sont pas équivalentes en termes de sensibilité et de spécificité. Elles permettent de détecter séparément IgM et IgG. La recherche d'IgM est très utile chez l'enfant et l'adolescent. Deux sérums à 3 semaines d'intervalle sont nécessaires à l'interprétation. Il existe des tests ELISA rapides détectant sur membrane les IgM seules, d'autres détectant simultanément les IgM et IgG. Ces trousses ont une sensibilité et une spécificité similaires aux autres trousses ELISA et offrent une grande rapidité d'exécution. Elles peuvent présenter un intérêt pour la détection des IgM chez l'enfant lorsque seul un sérum précoce est disponible.

Compte tenu de leur présence à l'état commensal, aucun test sérologique n'a pu montrer, en pratique courante, de résultat satisfaisant dans le diagnostic des infections génitales à *Ureaplasma* spp. ou *M. hominis*. Aucun test n'est commercialisé pour *M. genitalium*.

Pour en savoir plus

Atkinson P, Balish M, Waites K. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of Mycoplasma pneumoniae infections. FEMS Microbiol Rev 2008 ; 32 : 956–73.

Bébéar C. Mycoplasma et Ureaplasma. In : Courvalin P, Leclercq R, Bingen E, editors. L'Antibiogramme. 3e éd. Paris : ESKA ; 2012.

Bébéar CM, Pereyre S, Peuchant O. Mycoplasma pneumoniae : susceptibility and resistance to antibiotics. Future Microbiol 2011 ; 6 : 423–31.

Cazanave C, Manhart LE, Bébéar C. Mycoplasma genitalium, an emerging sexually transmitted pathogen. Med Mal Infect 2012 ; 42 : 381–92.

Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart LE. Mycoplasma genitalium infection and female reproductive tract disease : a meta-analysis. Clin Infect Dis 2015 ; 61 : 418–26.

Pereyre S, Bébéar CM, Bébéar C. Mycoplasma hominis, M. genitalium and Ureaplasma spp. In : Yu VL, et al., editors. Antimicrobial therapy and vaccines. Microbes, vol. I. Pittsburgh, PA : ESun Technologies ; 2015.

Pereyre S, Bébéar CM, Bébéar C. Mycoplasmes. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2014.

Waites KB, Bade DJ, Bébéar CM, et al. Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas : Approved guideline. Wayne (PA) : Clinical and Laboratory Standards Institute. Document M43-P.

Waites KB, Bébéar CM, Robertson JA, et al. Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. Cumitech 34 of American Society for Microbiology. Washington : ASM Press ; 2001. p. 1–30.

Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogens. Clin Microbiol Rev 2005 ; 18 : 757–89.

Adresse utile

Il n'existe pas de Centre national de référence pour les mycoplasmes. L'USC EA 3671, Infections humaines à mycoplasmes et à Chlamydiae INRA-Université de Bordeaux du Pr Cécile Bébéar est un laboratoire expert dans le domaine.

Chapitre 36

Bactéries cytoparasites obligatoires

B. de Barbeyrac, O. Peuchant, S. Ranger-Rogez

PLAN DU CHAPITRE

36.1 *Chlamydia*

B. de Barbeyrac, O. Peuchant

Introduction

Les *Chlamydia* sont des eubactéries à développement intracellulaire obligatoire formant une inclusion intracytoplasmique caractéristique. Deux espèces sont principalement rencontrées chez l'homme, *Chlamydia trachomatis* et ses 19 sérovars responsables de trachome (sérovars A-C), d'infections urogénitales sexuellement transmissibles (IST) (sérovars D-K) et de lymphogranulomatose vénérienne (sérovars L1–L3), et *Chlamydia pneumoniae*, biovar TWAR, responsable d'infections respiratoires. Une troisième espèce d'origine aviaire, *Chlamydia psittaci,* peut occasionnellement provoquer des pneumopathies sévères chez l'homme. *C. trachomatis* est en France le principal agent bactérien responsable d'infections sexuellement transmissibles (IST). Le caractère paucisymptomatique de l'infection urogénitale est à l'origine de la dissémination et des complications observées chez la femme jeune telles que les salpingites et les grossesses extra-utérines. Sa responsabilité dans le trachome et dans les IST en fait un agent prioritaire dans les problèmes de santé publique. L'évolution souvent chronique de l'infection à *Chlamydia* soulève la question de la persistance du micro-organisme.

Taxonomie

Dans la famille des *Chlamydiaceae*, la nouvelle taxonomie ne reconnaît qu'un seul genre *Chlamydia* et 9 espèces (Tableau 36.1). L'espèce *C. trachomatis* est spécifiquement humaine, et divisée en deux biovars, trachoma et lymphogranuloma venereum (LGV) et 19 sérovars. Le biovar trachoma comprend 14 sérovars : A, B, Ba et C (impliqués dans le trachome), D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J et K (impliqués dans les infections oculaires et génitales), et le biovar LGV comprend 4 sérovars, L1, L2, L2a et L3. Ces sérovars ont été définis d'après la réactivité d'anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes portés par la protéine majeure de membrane externe appelée MOMP pour *major outer membrane protein*. À l'heure actuelle, le typage est fondé sur la séquence du gène *omp*1, qui code pour la MOMP, étudiée soit par des techniques de PCR-RFLP, soit par séquençage, et la classification en génovar est équivalente à celle du sérovar.

C. pneumoniae a été isolée chez l'homme, mais aussi le koala et le cheval. Suivant la spécificité d'hôte, les souches ont été regroupées en trois biovars, TWAR, spécifiquement humain, et Koala et Équine.

Tableau 36.1 **Classification de la famille des *Chlamydiaceae*.**

Famille	Genre	Espèces	Hôte
Chlamydiaceae	*Chlamydia*	*C. trachomatis*	Homme
		C. pneumoniae souche TWAR	Homme
		C. psittaci	Oiseaux, accidentellement homme
		C. muridarum	Souris, hamster
		C. suis	Porc
		C. pecorum	Mammifères
		C. abortus	Mammifères (responsables d'avortement)
		C. felix	Chat
		C. caviae	Cochon d'inde

Les autres espèces sont isolées chez l'animal. *C. pecorum* est isolée des mammifères sans spécificité d'hôte, ruminants, marsupiaux et porc. *C. psittaci* regroupe les souches aviaires. *C. abortus*, *C. felis*, *C. caviae, C. muridarum* et *C. suis* regroupent des souches responsables d'avortement chez les ruminants, les souches isolées du chat, du cochon d'Inde, de la souris et du porc, respectivement. Très récemment, de nouvelles espèces ont été décrites, *C. gallinacea*, *C. avium* et *C. ibidis*, respectivement chez des volailles, psittacidés/pigeons et ibis sacrés.

Caractéristiques biologiques des *Chlamydia*

La bactérie existe essentiellement sous deux formes, le corps élémentaire (CE) et le corps réticulé (CR). Le CE adapté au transit extracellulaire est incapable de se multiplier et constitue la forme infectieuse. Le CR, adapté au milieu intracellulaire, est non infectieux et constitue la forme métaboliquement active de la bactérie.

Structure du corps élémentaire

De forme sphérique, le CE est de petite taille (200 à 400 nm de diamètre), limité par une membrane cytoplasmique et par une paroi proche de celle des bactéries à Gram négatif, composée d'une membrane interne et d'une membrane externe contenant du LPS semblable à celui des bacilles à Gram négatif. Cependant, une caractéristique remarquable de la paroi du CE est l'absence de peptidoglycane.

La membrane externe comprend plusieurs protéines riches en résidus cystéine dont la MOMP de poids moléculaire de 40 kDa. Ces protéines assurent la rigidité de la membrane. Chez *C. trachomatis*, la MOMP est un puissant immunogène et elle porte les épitopes spécifiques de sérovars. Le séquençage du génome entier a permis d'identifier une nouvelle famille de protéines de membrane, appelée POMP pour *polymorphic outer membrane protein*. Ces protéines seraient douées de variations antigéniques en réponse à une pression immunologique, variations jouant probablement un rôle dans le phénomène de persistance.

À côté de ces protéines riches en cystéine, il existe d'autres protéines désignées d'après leur masse moléculaire comme les protéines de stress hsp 60 et hsp 70.

Caractéristiques génomiques

La séquence du génome de plusieurs souches de chacune des espèces de *Chlamydia* est disponible. L'analyse de ces séquences remet en cause certaines notions bien établies comme l'absence de peptidoglycane (PG) et l'exigence obligatoire en ATP. La totalité des gènes nécessaires à la synthèse du PG et plusieurs ATPases ont été identifiés. Le rôle des gènes du PG dans la biologie des *Chlamydia* n'est pas élucidé. Chopra et al. ont émis l'hypothèse que du PG serait synthétisé de manière provisoire lors de la multiplication du CR puis dégradé lors de la différenciation du CR en CE. Ce PG jouerait un rôle atypique dans la septation, hypothèse soutenue par l'absence de gène *ftsZ*, normalement requis pour la division cellulaire bactérienne. Elle possède des protéines de liaison aux pénicillines (PLP). La présence de PLP et la synthèse transitoire de PG expliqueraient la sensibilité paradoxale des *Chlamydiae* à la pénicilline G. Récemment, il a été démontré la synthèse de PG lors de la transformation du CE en CR dès 8 heures postinfection, apportant la preuve d'un PG fonctionnel.

L'analyse des séquences a révélé d'autres points importants comme l'abondance des systèmes de transport, la présence d'une famille de protéines nommées POMP citée plus haut, et des gènes codant pour un système de sécrétion type III (SSTT). Ces gènes joueraient un rôle clé dans les échanges entre la cellule et la bactérie. Il a été montré qu'une zone dite de « plasticité » diffère en taille suivant les souches de *C. trachomatis* d'environ 20 à 25 kpb. Ces variations en taille sont dues à des délétions dans cette zone qui code pour une cytotoxine. Ainsi, une caractéristique de la souche D/UW-3/Cx responsable d'IST est d'exprimer une cytotoxine. Une autre caractéristique est liée à la présence d'une tryptophane synthétase dans les souches de *C. trachomatis* responsables d'IST et non dans celles responsables du trachome. Or, la tryptophane synthétase catalyse la conversion de l'indole en tryptophane, catabolite de nombreuses bactéries présentes dans la sphère génitale. On sait qu'au cours de la réponse immunitaire, l'INFγ induit l'expression d'une IDO (indoléamine 2.3-dioxygénase) qui catabolise le tryptophane, ce qui entraîne un arrêt de la multiplication de la bactérie. Les souches génitales seraient donc moins sensibles à l'action de l'IFNγ que les souches de trachome.

La présence d'un plasmide cryptique a été démontrée dans presque toutes les souches de *C. trachomatis* et certaines souches de *C. psittaci*, alors qu'aucun plasmide n'a pu être mis en évidence chez *C. pneumoniae*. L'identification de souches cliniques de *C. trachomatis* dépourvues de ce plasmide montre qu'il n'est pas nécessaire au développement et au caractère infectieux de la bactérie. Ce plasmide est séquencé et comprend 7493 pb. Une souche délétée de 377 pb sur le plasmide a été responsable d'une épidémie en Suède en 2006–2007 du fait qu'elle n'était pas détectée par les techniques moléculaires ciblant précisément cette zone. Cela montre l'instabilité des gènes sur les plasmides et le

risque de les utiliser dans les techniques de détection. La leçon que les industriels ont retenue est qu'il est nécessaire d'utiliser deux cibles pour un même micro-organisme pour éviter ce genre d'incident.

Cycle de développement

Le cycle de développement est identique quelle que soit l'espèce malgré quelques différences de morphologie entre les inclusions. Le cycle peut être divisé en plusieurs étapes (Fig. 36.1) :

1. attachement initial du CE à la cellule hôte ;
2. entrée dans la cellule hôte ;
3. différenciation des CE en CR et multiplication des CR ;
4. différenciation des CR en CE ;
5. relargage des CE. Le mécanisme le plus important de relargage des CE infectieux est probablement la lyse de la cellule.

Deux caractéristiques sont à noter, premièrement la cellule hôte de type épithélial n'est pas un phagocyte professionnel, et deuxièmement, l'internalisation s'achève par la formation d'une inclusion dans le cytoplasme de la cellule hôte (Fig. 36.2).

Altération du cycle de développement : notion de persistance

Dans certaines conditions, le cycle de développement est altéré ; le CR ne se transforme pas en CE mais persiste dans une forme altérée, appelée corps aberrant. Le terme de persistance correspond à une association bactérie–hôte dans laquelle la bactérie est viable mais non cultivable.

In vitro, des facteurs induisant la persistance ont pu être identifiés. Il s'agit d'antibiotiques comme la pénicilline G, de facteurs d'ordre nutritionnel comme une déplétion en cystéine et immunitaire comme la présence d'IFNγ et le développement dans des cellules non permissives, monocytes, cellules synoviales. Les pénicillines ne sont pas bactéricides mais interrompent le développement normal, donnant des formes anormales, incapables de division binaire.

In vivo, les implications sont importantes et contribueraient à l'immunopathogénicité de la maladie oculaire et génitale. Cette notion de persistance a des conséquences sur le diagnostic et le traitement. Les outils de diagnostic permettent généralement de mettre en évidence la bactérie dans sa forme normale et cultivable et non dans cette forme aberrante. Seules les techniques de biologie moléculaire permettent d'identifier la bactérie et de poser le diagnostic. Concernant le traitement, les formes persistantes ne répondent pas aussi bien aux antibiotiques que les formes normales. En effet, les formes persistantes contiennent des taux réduits de MOMP, d'où une diminution du transport des antibiotiques. De plus, la persistance est une réponse au stress et ces réponses sont connues pour induire une moindre sensibilité aux antibiotiques des bactéries.

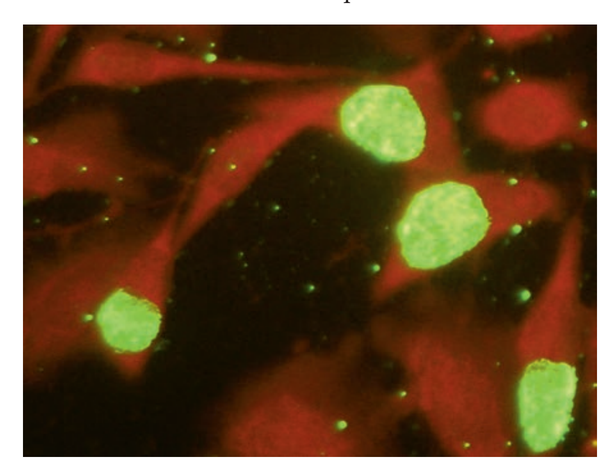


Fig. 36.2 Tapis cellulaire infecté par *C. trachomatis* après 48 heures d'incubation. Les inclusions apparaissent vertes fluorescentes après coloration par un anticorps monoclonal anti-MOMP fluorescent (objectif ×100). Les points verts fluorescents sont des CE extracellulaires.

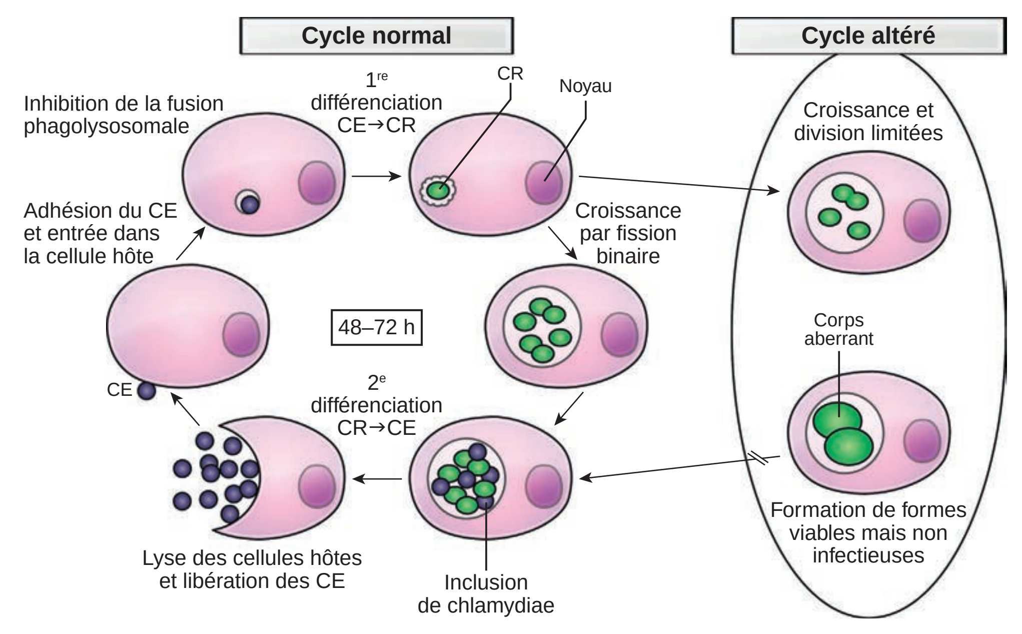


Fig. 36.1 Cycle de développement des *Chlamydia*. CE : corps élémentaire ; CR : corps réticulé.

Pouvoir pathogène (Tableau 36.2)

C. trachomatis

Trachome

Le trachome est une maladie infectieuse des yeux qui peut provoquer une cécité après des réinfections répétées. Il s'agit de la principale cause de cécité évitable au niveau mondial et la maladie survient là où les gens vivent dans des conditions de surpeuplement avec un accès limité à l'eau et aux soins de santé. En 2012, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que le trachome est à l'origine de déficiences visuelles chez 2,2 millions de personnes dont 1,2 million ont une cécité irréversible. Le trachome cécitant est répandu au Moyen-Orient, en Afrique du Nord et subsaharienne, dans des parties du sous-continent indien, en Asie du Sud et en Chine. À l'échelle mondiale, on estime que le trachome cécitant est endémique dans 53 pays d'Afrique, d'Amérique du Sud et d'Asie du Sud-Est. Il est dû aux sérovars A, B, Ba et C. L'homme est le seul réservoir et la transmission se fait à partir du réservoir familial par les mains sales, les poussières véhiculées par le vent et les mouches.

L'OMS a créé l'Alliance mondiale pour l'élimination du trachome d'ici 2020 en mettant en place la stratégie CHANCE (Chirurgie, Antibiothérapie, Nettoyage du visage, Changer l'Environnement).

Le trachome est une kératoconjonctivite chronique, contagieuse, caractérisée par la formation de follicules, puis les vaisseaux sanguins du limbe envahissent la cornée, réalisant le pannus. L'évolution peut se faire spontanément vers la guérison, mais en zone d'endémie, les réinfestations successives aggravent le pannus et l'évolution se fait vers un stade cicatriciel avec déformation du tarse et incurvation de la paupière (entropion), et vers la cécité par formation de travées fibreuses.

Infections sexuellement transmissibles (IST)

Lymphogranulomatose vénérienne ou maladie de Nicolas-Favre

La LGV est une IST, très répandue dans les régions tropicales, plus rare dans les pays industrialisés, où elle atteint essentiellement les homosexuels masculins, les prostituées ou les voyageurs de retour de zone d'endémie. Elle est due aux sérovars L1, L2, L2a et L3 de *C. trachomatis* qui possèdent un tropisme réticulo-endothélial et ganglionnaire.

La symptomatologie de la LGV est assez riche, sensiblement différente selon le sexe, et attribuable à l'atteinte lymphatique et ganglionnaire. La maladie débute par un chancre génital, 1 à 3 semaines après le contage, qui passe inaperçu dans plus de 50 % des cas. L'existence d'un chancre étant exceptionnellement un motif de consultation, la LGV est révélée par deux tableaux cliniques : l'adénite inguinale et la rectite aiguë. Dans le cas de la LGV rectale, les symptômes sont essentiellement des douleurs rectales avec écoulement anal et un ténesme.

Une recrudescence de l'infection anorectale chez les homosexuels est en cours en Europe et en France, notamment chez les patients séropositifs pour le VIH. Les souches circulantes sont de type L2. Entre 2002 et 2010, le Centre national de référence (CNR) a typé 1576 échantillons anorectaux et comptabilisés 1081 cas de LGV et 495 d'infection rectales à souche nonL. Après 2010, le CNR a monté un réseau de surveillance. Au total, en 2014, le nombre de cas de LGV s'élève à 2173 dont 1727 viennent de Paris (79,47 %) et les autres de province, et celui d'anorectite à souches non L à 1840. La surveillance par ce réseau montre une augmentation des cas de LGV en 2013 qui se poursuit en 2014. Cette augmentation n'est pas seulement due à un élargissement de la couverture de surveillance du réseau, mais à un véritable rebond de l'épidémie, comme le montre le nombre de cas qui a doublé, dans les laboratoires pérennes, depuis 2010. La LGV anorectale est plus souvent symptomatique que l'anorectite à souche non L (95,7 % versus 41,7 %, $p < 0,05$ %). L'orientation sexuelle ne diffère pas significativement entre les patients LGV et non LGV ; 95,2 % des patients LGV sont des hommes ayant des relations avec les hommes versus 91,8 % des patients non LGV ($p > 0,05$). Les patients atteints de LGV sont significativement plus âgés que les patients atteints d'anorectites à souches non L (42,5 versus 34,3 ans, $p < 0,05$).

L'infection est majoritairement une infection anorectale ; le CNR n'a recensé que 64 cas de LGV génitales sur ces dix dernières années. Toutes ces données sont accessibles dans les comptes-rendus du CNR disponibles sur le site du CNR (www.cnrchlamydiae.u-bordeaux2.fr).

Tableau 36.2 **Pouvoir pathogène de *C. trachomatis.***

Sérovars	Spécialités	Pathologies	Transmission
A, B, Ba, C	Ophtalmologie	Trachome	Indirecte
D, K	Ophtalmologie	Conjonctivite de l'adulte	Indirecte
	Pédiatrie	Pneumopathie Conjonctivite	Relation mère–enfant
	Rhumatologie	Arthrite réactionnelle Syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter	Relations sexuelles
	Gynécologie/urologie	Infection génitale basse et haute F : cervicite, endométrite, salpingite, périhépatite H : urétrite, épididymite	Relations sexuelles
	Gastro-entérologie	Rectite, ulcération génitale	Relations sexuelles
L1, L2, L3	Gastro-entérologie	Lymphogranulomatose vénérienne F et H : rectite, ulcération génitale	Relations sexuelles

Infections urogénitales (sérovars D à K)

Les infections à *C. trachomatis* chez l'homme et la femme ont une répartition mondiale.

L'infection à *C. trachomatis* est la plus fréquente des IST bactériennes rapportées en Europe. En 2011, 347 000 cas ont été rapportés dans 23 pays de l'union européenne, correspondant à 175 cas/100 000 habitants, plus fréquemment chez la femme (203 cas/100 000) que chez l'homme (145/100 000) (www.ecdc.europa.eu). Récemment en France, une étude réalisée par l'Institut national de veille sanitaire (InVs) à la suite d'un contrôle de qualité a évalué pour la première fois l'incidence de l'infection en France qui s'élève à 257 cas/100 000 habitants âgés de 15 à 49 ans. Du fait du caractère paucisymptomatique de l'infection urogénitale, l'infection peut rester méconnue. Non traitée, elle peut être à l'origine de complications telles que stérilité et grossesse extra-utérine. Le coût annuel des infections à *C. trachomatis* et de leurs séquelles est estimé à plus de 2 billions de dollars aux États-Unis.

L'incidence des infections génitales est variable suivant les populations, l'activité sexuelle et l'âge. Les facteurs de risque de l'acquisition d'une infection à *C. trachomatis* incluent l'âge inférieur à 25 ans chez la femme, 30 ans chez l'homme, la multiplicité des partenaires sexuels, un nouveau partenaire, le célibat, la non-utilisation de préservatifs et l'utilisation de contraceptifs oraux. En France, pour le réseau de surveillance des laboratoires RENACHLA, le taux de positivité (nombre de cas positifs/nombre de recherche) a augmenté de 2,5 % à 7 %, entre 2000 et 2013, ce qui témoigne d'un dépistage ciblé sur les personnes les plus à risque. Dans la population générale, les résultats de l'enquête Natchla ont montré que la prévalence était la plus élevée chez les 18–29 ans (hommes : 2,5 %, femmes : 3,2 %). Plus récemment, une enquête par Internet a montré une prévalence de 6,8 % parmi les jeunes de moins de 25 ans (hommes : 4,3 % ; femmes : 8,3 %).

Chez l'homme, l'infection à *C. trachomatis* représente la cause principale des urétrites non gonococciques (UNG) et postgonococciques. Dans la majorité des cas, elle se présente comme une urétrite subaiguë avec un écoulement peu abondant, séreux, spontané ou provoqué à la pression du canal urétral, se limitant parfois à une simple goutte matinale. La période d'incubation peut aller de 48 heures à plus de 2 mois (12 à 16 jours en moyenne) après le contact infectant.

Chez la femme, l'infection réalise le plus souvent une cervicite, asymptomatique. L'infection est souvent de découverte fortuite lors d'un bilan gynécologique systématique ou à l'occasion d'une consultation motivée par l'apparition d'une urétrite chez le partenaire. La cervicite varie dans son intensité. Le col est souvent œdématié, congestif et friable. Cette localisation cervicale peut s'accompagner d'une localisation urétrale, sans pour autant entraîner des symptômes à type d'urétrite ou de dysurie. Une leucocyturie amicrobienne isolée doit faire évoquer une infection à *Chlamydia*.

Cette infection peut disséminer au haut appareil génital et donner une endométrite, une salpingite voire un syndrome de Fitz-Hugh-Curtis. Stérilité et grossesse extra-utérine sont les complications redoutées de ces infections hautes.

Étant donné le caractère asymptomatique de l'infection et les complications graves possibles, il est recommandé de dépister cette infection chez les jeunes, femmes de moins de 25 ans et hommes de moins de 30 ans, sur un premier jet d'urine chez l'homme et un auto-écouvillonnage vaginal par des techniques d'amplification génique in vitro. Cette recommandation de la Haute autorité de santé (HAS) doit être appliquée dans tous les lieux à vocation de dépistage comme les centres de dépistage anonyme et gratuit, les centres de planification familiale et les centres d'orthogénie.

Infections à localisation extragénitale (sérovars D à K)

Chez l'homme et la femme, *C. trachomatis* est responsable de conjonctivite par auto-inoculation à partir d'un foyer génital. L'infection peut disséminer et donner un tableau de Fiessenger-Leroy-Reiter associant urétrite, arthrite et conjonctivite.

Le nouveau-né acquiert *C. trachomatis* principalement lors du passage de la filière génitale à partir de l'infection cervicale maternelle. Le taux de contamination du nouveau-né à la naissance est élevé, de 50 à 70 %. Parmi les nouveau-nés contaminés, plus de 50 % présentent une conjonctivite, environ 20 % une pneumopathie et les autres restent asymptomatiques.

En cas de pneumopathie, les enfants présentent une toux persistante, sèche, devenant coqueluchoïde, sans fièvre, et une discrète altération de l'état général. Il peut s'installer une dyspnée de type polypnée avec cyanose et parfois une tachycardie. La pneumonie peut être grave avec détresse respiratoire, hypoxémie et apnées.

C. pneumoniae

Infections respiratoires

Le seul réservoir de *C. pneumoniae* biovar TWAR est humain et la transmission se fait de personne à personne par voie aérienne. L'infection se propage par les sujets infectés mais aussi par les porteurs asymptomatiques. *C. pneumoniae* est un des agents infectieux les plus répandus ; la répartition de l'infection est mondiale. Le pic de séroconversion se situe entre 5 et 14 ans et la séroprévalence continue d'augmenter chez l'adulte pour atteindre 75 % chez les personnes âgées. Étant donné que la primo-infection induit une réponse immunitaire pendant un temps limité (3 à 5 ans), ce taux de prévalence élevé suggère que la plupart des gens sont réinfectés tout au long de leur vie. Après la primo-infection, la bactérie peut persister dans l'organisme et représente un risque potentiel d'infection chronique.

Cependant, des études récentes montrent que la prévalence des infections respiratoires dues à *C. pneumoniae* serait beaucoup plus basse (< 1,5 %) qu'initialement décrite (6–22 %). Cette apparente diminution des infections à *C. pneumoniae* peut être due à un changement des caractéristiques épidémiologiques de l'infection ou à un manque de spécificité des tests diagnostiques. En effet, les techniques de recherche directe de *C. pneumoniae* sont très décevantes et le sérodiagnostic est d'interprétation difficile.

Maladie coronarienne

Les mécanismes de l'athérosclérose sont encore débattus. La théorie dominante considère la plaque comme un foyer inflammatoire chronique. L'approche inflammatoire revient à poser la question de l'agresseur.

C'est en 1988 qu'une étude sérologique met en évidence une association entre *C. pneumoniae* et l'infarctus du myocarde. Depuis, *C. pneumoniae* a été détectée dans les lésions athéromateuses coronariennes par PCR, immunofluorescence directe et/ou microscopie électronique dans plus d'une trentaine d'études. L'isolement de *C. pneumoniae* est exceptionnel et cinq études rapportent des cultures positives (26 souches) à partir d'artères coronaires.

Les modèles cellulaires et expérimentaux apportent les arguments les plus convaincants. Cependant, les essais thérapeutiques n'ont pas donné les résultats bénéfiques escomptés. Les résultats négatifs de ces études ne permettent pas d'exclure totalement l'hypothèse infectieuse. Il est possible que les modalités de traitement, doses, rythme, durée, ne soient pas efficaces, d'autant plus que *C. pneumoniae* infectant les monocytes semble insensible aux antibiotiques. Dans l'état actuel des connaissances, les antibiotiques ne semblent pas avoir leur place dans le traitement de la maladie coronaire.

Asthme

Les différentes études sur l'association entre l'infection à *C. pneumoniae* et l'exacerbation de l'asthme chez l'enfant et l'adulte donnent des résultats contradictoires, probablement liés aux difficultés diagnostiques de l'infection à *C. pneumoniae*.

C. psittaci

La psittacose est une maladie rare mais qui pose un véritable problème de santé publique car elle touche des professionnels travaillant dans la filière aviaire. *C. psittaci* a été détectée chez plus de 450 espèces d'oiseaux domestiques et sauvages à travers le monde. Si, chez les psittacidés, la chlamydiose est le plus souvent symptomatique, elle est presque toujours inapparente chez les volailles. Les oiseaux infectés, qu'ils soient malades ou non, excrètent via leurs déjections un grand nombre de bactéries dans l'environnement. Depuis février 2006, la chlamydiose aviaire ou ornithose-psittacose est une maladie à déclaration obligatoire pour toutes les espèces d'oiseaux. Cependant, cette maladie reste peu déclarée, bien que cette déclaration n'entraîne aucune mesure de police sanitaire.

Chez l'homme, la maladie débute brutalement après 1 à 2 semaines d'incubation et peut aller d'une forme pseudogrippale à une pneumopathie sévère voire mortelle. La fièvre est souvent présente, accompagnée d'une toux sèche non productive. L'examen radiologique montre une infiltration localisée ou diffuse. Les manifestations extrarespiratoires ne sont pas rares. Il s'agit de manifestations neurologiques (troubles de la conscience, méningite lymphocytaires aiguë, méningo-encéphalite, etc.), cardiaques (endocardite, myocardite, péricardite), hépatiques, rénales, hématologiques, musculaires, cutanéomuqueuses, oculaires, ganglionnaires. L'homme peut se contaminer auprès des oiseaux malades ou porteurs sains par contact direct ou par inhalation de poussières contaminées. Dans les professions les plus exposées (éleveurs d'oiseaux ou de volailles, personnels d'abattoir de volailles, magasins d'oiseaux, vétérinaires), les risques de transmission existent lors d'activités favorisant le contact avec les poussières ou des aérosols contaminés par les fientes. L'exposition peut persister plusieurs mois en l'absence de mesures spécifiques. Les taux d'attaque lors des épidémies en milieu professionnel varient de 10 à 45 %, selon les activités professionnelles, la virulence des souches de *C. psittaci* et vraisemblablement la sensibilité des professionnels. La contamination lors de la manipulation en laboratoire de prélèvements infectés par *C. psittaci* est également possible.

Le CNR exerce une surveillance non exhaustive des cas de psittacose et déclare à l'InVs une dizaine de cas par an.

Diagnostic bactériologique direct

Les méthodes de diagnostic direct des infections à *Chlamydia* varient en fonction de l'espèce. L'isolement par culture cellulaire, qui exige un équipement particulier, manque de sensibilité et n'est pas une bonne méthode de routine. Les méthodes d'amplification génique se sont largement développées pour la détection des *Chlamydiae*, particulièrement pour *C. trachomatis*.

Prélèvements

Dans le cadre de l'infection génitale, *C. trachomatis* peut être recherchée à partir de prélèvements urétraux, premier jet d'urine ou rectaux chez l'homme, prélèvements endocervicaux, vaginaux (autoprélèvements) ou prélèvements de la sphère génitale haute chez la femme, ulcérations génitales ou biopsies ganglionnaires chez l'homme et la femme.

Chez le nouveau-né, *C. trachomatis* peut être recherchée dans les prélèvements conjonctivaux et respiratoires.

Dans le cadre du trachome, le prélèvement est fait par grattage de la conjonctive supérieure au niveau des follicules.

Dans le cadre de l'infection respiratoire, *C. pneumoniae* et *C. psittaci* peuvent être recherchées dans les prélèvements de gorge, expectorations, mais aussi lavage bronchoalvéolaire et liquide pleural.

Milieux de transport

Seule la culture exige des conditions strictes de transport (délai et température), de manière à ne pas affecter la viabilité de la bactérie. *C. pneumoniae* est l'organisme le plus fragile, *C. trachomatis* est moins fragile et *C. psittaci* est très stable puisqu'il peut même persister dans les poussières contaminées pendant des mois sans perdre sa vitalité.

Les milieux de transport et les conditions de transport du prélèvement sont adaptés à la technique de détection. La détection par les méthodes d'amplification d'ADN bactérien peut être réalisée sur écouvillon sec sans milieu de transport, conservé à température ordinaire.

Techniques de diagnostic

Pour *C. trachomatis*, la nomenclature des actes de biologie médicale n'autorise le remboursement de la détection de *C. trachomatis* que par la recherche d'ADN ou d'ARN par amplification génique in vitro sur tout type d'échantillons à partir de sites possiblement infectés. De nombreux systèmes de détection de *C. trachomatis* par amplification génique

sont disponibles sur le marché français. Des essais comparatifs des différentes plateformes (Cobas 4800® Roche, Abbott m2000®, Hologic Aptima Combo 2® et BD ProbeTec Viper®) montrent des taux de concordance de 98 % et 98,3 % sur les urines masculines et de 98,8 % et 99,2 % sur les écouvillons endocervicaux. Tous ces automates sont équipés d'un extracteur et d'un amplificateur permettant de réaliser des séries plus ou moins importantes avec de parfaites robustesse et traçabilité. Ils présentent tous l'avantage de détecter simultanément *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*.

L'utilisation croissante de ces outils devrait permettre un meilleur dépistage des IST bactériennes et donc une meilleure prise en charge des personnes infectées, et rompre la chaîne de transmission.

La détection directe de *C. pneumoniae* est difficile. Une revue a dénoncé les écueils des PCR « maison », notamment dans la détection de *C. pneumoniae* pour lequel de nombreux faux positifs en raison de contamination ou de manque de spécificité des amorces ont été décrits. À l'heure actuelle, les techniques se sont bien améliorées ; quelques trousses sont commercialisées, le plus souvent en multiplex avec *Mycoplasma pneumoniae*, et montrent de bonnes performances. Avec ces nouveaux outils, les recherches positives restent exceptionnelles. À titre d'exemple, sur ces dix dernières années, des auteurs ont observé un taux de prévalence de 0,1 % (2 patients PCR +) alors que, dans le même temps, le taux de positivité à *M. pneumoniae* était de 4,1 %. De même, au CNR des infections à *Chlamydiae* sur la même période, le taux de positivité de *C. pneumoniae* était < 0,1 % (2 patients PCR +) alors que celui de *M. pneumoniae* était de 8,2 % (résultats personnels). Un résultat de PCR positif à *C. pneumoniae* doit être interprété avec prudence et confronté aux données cliniques et biologiques, notamment sérologiques, étant donné la possibilité de portage asymptomatique et de persistance de la bactérie.

Dans le cas de *C. psittaci*, il n'existe pas de système commercialisé et le diagnostic par amplification génique est limité aux laboratoires utilisant un système maison. C'est pourquoi le moyen diagnostic le plus couramment utilisé demeure le sérodiagnostic.

Sérodiagnostic

Le sérodiagnostic consiste en la mise en évidence des anticorps circulants. Au cours d'une infection à *Chlamydia*, la réponse anticorps est complexe et fait intervenir des anticorps spécifiques de genres, d'espèces et de sérovars.

La technique de référence reste la micro-immunofluorescence (MIF), utilisant des suspensions de CE et de CR cultivés sur œuf de chacun des sérovars de *C. trachomatis* et des souches de *C. psittaci* et *C. pneumoniae.* Cette technique différencie et titre toutes les classes d'immunoglobulines humaines ou spécifiquement les anticorps de la classe IgG, IgA ou IgM.

Les techniques immuno-enzymatiques utilisent pour *C. trachomatis* soit des peptides spécifiques de MOMP, soit une fraction de LPS sous forme recombinante, et pour *C. pneumoniae* un broyat de bactéries fixé sur les puits d'une microplaque. Ces techniques ont l'avantage d'être rapides, automatisées et de lecture objective. Cependant, l'appréciation quantitative n'est pas bien codifiée.

D'une manière générale, la recherche d'anticorps anti-*Chlamydia* n'a pas la même valeur diagnostique que la mise en évidence de la bactérie. D'une part, en raison des communautés antigéniques qui existent entre les trois espèces, et d'autre part, en raison de la persistance des anticorps des mois voire des années après l'infection, il est souvent difficile de distinguer une cicatrice sérologique d'une réelle infection en évolution.

Infection à *C. trachomatis*

Dans les infections génitales basses ainsi que dans le trachome, le sérodiagnostic a peu d'intérêt car l'infection restant superficielle, le taux d'anticorps est faible. En revanche, dans les infections profondes à *C. trachomatis*, le sérodiagnostic prend tout son intérêt étant donné l'accessibilité difficile du site infectieux chez l'homme comme chez la femme. Les infections profondes comme les salpingites, l'infertilité et les grossesses extra-utérines chez la femme ou la LGV et les arthrites s'accompagnent d'une montée d'anticorps qu'il est possible d'utiliser dans le diagnostic. La sérologie entre davantage dans le bilan d'extension de l'infection que dans le diagnostic de l'infection. La dernière modification de la nomenclature (*Journal Officiel* du 5 octobre 2011, acte 1307, B40) précise les indications et la technique du sérodiagnostic. Sa prise en charge est limitée aux indications suivantes :

- chez l'homme et la femme, en cas de suspicion d'infections hautes, de suspicion de LGV (ulcération génitale, rectite), d'un bilan d'hypofertilité du couple, du diagnostic d'une arthrite réactionnelle ou d'un syndrome de Fiessinger–Leroy-Reiter ;
- chez le nouveau-né ou le nourrisson, en cas de suspicion de pneumopathie atypique.

Le texte précise que le sérodiagnostic doit être fait avec des techniques utilisant des antigènes spécifiques de *C. trachomatis*. Les techniques d'immunofluorescence indirecte doivent être abandonnées dans cette indication en raison de leur manque de spécificité. Les trousses ELISA utilisant des peptides recombinants de la protéine majeure de membrane externe de *C. trachomatis* permettent un diagnostic spécifique d'espèce. Un taux élevé d'IgG est significatif d'une infection passée ou en cours. Il est inutile de suivre la cinétique des IgG car, étant donné l'évolution de la maladie et les nombreuses recontaminations, il est impossible de mettre en évidence une séroconversion ou une augmentation significative d'anticorps. Si la présence d'anticorps n'est pas synonyme d'infection compliquée, leur absence l'exclut. Étant donné la persistance des anticorps, il est impossible de distinguer une infection passée guérie (cicatrice sérologique) d'une infection persistante. Les IgA, par leur demi-vie courte, ont été proposées comme marqueur d'infection récente. L'étude des profils sérologiques des personnes dont l'infection était documentée par PCR a montré que l'absence d'IgA sérique n'était pas un marqueur de guérison et que leur présence n'était pas un marqueur d'infection récente. C'est pourquoi la recherche des IgA a été supprimée de manière à éviter des traitements prolongés uniquement sur le critère de la présence ou de la persistance des IgA. Après traitement, les anticorps persistent à un taux élevé pendant plusieurs mois et la sérologie ne permet pas de surveiller l'évolution de la maladie ; il est donc inutile de contrôler un titre d'anticorps après traitement.

Infection à *C. pneumoniae*

En primo-infection, la réponse sérologique est lente. Les IgM apparaissent 2 à 3 semaines après le début de la maladie et disparaissent en 2 à 6 mois. Les IgG atteignent des taux élevés en 6 à 8 semaines. L'infection à *C. pneumoniae* n'induisant pas une bonne protection immune, les réinfections sont possibles. En cas de réinfection, les IgM n'apparaissent pas et le taux d'IgG augmente rapidement en 1 à 2 semaines. En l'absence d'IgM, le diagnostic ne peut qu'être rétrospectif puisqu'un deuxième sérum est nécessaire pour observer l'augmentation par 4 du taux d'anticorps. Le diagnostic d'infection aiguë est porté sur une séroconversion ou une augmentation de titre entre deux sérums (au moins deux dilutions) ou la présence d'IgM. Un titre isolé d'IgG > 512 n'est significatif qu'associé à une recherche directe positive. L'écueil majeur du sérodiagnostic est son absence de spécificité en raison de l'utilisation de la bactérie entière plus ou moins délipidée. De nombreux travaux portent sur l'identification de protéines immunodominantes, spécifiques de *C. pneumoniae*. En attendant la mise au point de tests sérologiques utilisant des protéines recombinantes spécifiques de *C. pneumoniae*, le sérodiagnostic tel qu'il se fait à l'heure actuelle devrait être abandonné

Infection à *C. psittaci*

La psittacose s'accompagne souvent de titres élevés d'anticorps (> 1/256), mais des réactions croisées avec les deux autres antigènes gênent souvent l'interprétation. Cependant, une augmentation significative du taux d'anticorps anti-*C. psittaci* est caractéristique. Un cas suspect est un cas présentant un tableau clinique compatible avec une psittacose et une exposition à des oiseaux. Un cas est confirmé si la recherche directe (culture ou PCR) est positive, ou si une séroconversion ou une augmentation significative du titre des anticorps (× 4) sur deux échantillons prélevés à 2 semaines d'intervalle en présence ou non d'IgM (≥ 1/16) est observée. Un cas est probable si le titre d'anticorps IgG est ≥ 1/128 ou s'il est < 1/128 associé à des IgM. Un cas est possible s'il est lié épidémiologiquement à un cas confirmé avec un titre d'IgG < 1/128 sans IgM.

Sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des souches ne se fait pas en routine étant donné la lourdeur des techniques. La méthode usuelle de détermination de la sensibilité de *Chlamydia* aux antibiotiques comporte une étape de culture de la bactérie sur lignées cellulaires en présence de concentrations croissantes d'antibiotique, suivie d'une détection au microscope des inclusions chlamydiennes colorées le plus souvent par un anticorps fluorescent.

Des techniques de biologie moléculaire ont été développées pour des bactéries de croissance difficile. Elles consistent à mesurer l'inhibition de croissance bactérienne par quantification soit de l'ADN, soit des transcrits par PCR en temps réel.

Antibiotiques actifs

Peu d'antibiotiques sont naturellement actifs sur *Chlamydia*. Parmi les antibiotiques potentiellement actifs, on trouve, dans un ordre d'activité décroissante in vitro, la rifampicine avec les CMI les plus basses, les tétracyclines, notamment la minocycline et la doxycycline, les fluoroquinolones les plus récentes comme la moxifloxacine, les macrolides comme l'azithromycine, et certaines fluoroquinolones moins récentes comme l'ofloxacine. Une nouvelle quinolone non fluorée, la némonoxacine, semble très prometteuse du fait de sa bonne activité sur *C. trachomatis* et *C. pneumoniae* et sur les souches de *N. gonorrhoeae* résistantes à le ciprofloxacine. L'activité des antibiotiques sur *C. pneumoniae* et *C. trachomatis* est comparable (Tableau 36.3).

Les *Chlamydia* présentent une résistance naturelle aux aminosides, à la vancomycine, aux quinolones de première génération, au métronidazole et à la colimycine. Parmi les β-lactamines, seule la pénicilline G et l'amoxicilline présentent une certaine activité en bloquant la multiplication du CR, mais qui est réversible après l'élimination de l'antibiotique.

In vivo, la résistance acquise aux antibiotiques chez *C. trachomatis* est peu documentée. In vitro, il a été possible de sélectionner des mutants résistants.

Conséquences thérapeutiques

Infections à *C. trachomatis*

Étant donné les possibilités de transmission sexuelle et de dissémination de l'infection aux voies génitales hautes, il est important de traiter spécifiquement l'infection à *C. trachomatis*.

Suivant les recommandations récentes de l'Agence nationale de surveillance du médicament et des produits de santé (ANSM), le traitement de première intention des infections urogénitales non compliquées fait appel à l'azythromycine en « traitement minute » à la dose de 1 g per os en une seule

Tableau 36.3 **Activité des antibiotiques vis-à-vis de *C. trachomatis* et *C. pneumoniae* (écart de CMI mg/l).**

	C. trachomatis	*C. pneumoniae*
Rifampicine	0,005–0,2	0,00125–0,0025
Tétracyclines		
Minocycline	0,001–0,2	0,015–0,03
Doxycycline	0,01–0,2	0,03–0,5
Macrolides vrais et apparentés		
Érythromycine	0,1–1	0,063–0,25
Roxithromycine	0,125–0,25	0,06–0,2
Azithromycine	0,03–1	0,125–0,5
Josamycine	0,01–1	0,25
Clarithromycine	ND	0,016–0,063
Télithromycine	ND	0,031–0,25
Fluoroquinolones		
Ofloxacine	0,5–4	0,5–2
Lévofloxacine	0,5–2	0,5–1
Moxifloxacine	0,03–0,06	0,125–1

ND : non déterminé.

prise ou à la doxycycline 100 mg per os, 2 fois par jour, pendant 7 jours. Les alternatives thérapeutiques reposent sur l'érythromycine ou l'ofloxacine.

Il est indispensable de traiter parallèlement le(s) partenaire(s) et d'avoir des relations sexuelles protégées pendant le traitement.

Les infections génitales hautes et la LGV se traitent plus longtemps que les infections basses, pendant 14 à 21 jours.

La possibilité de persistance de l'infection après traitement justifie la mise en place d'un contrôle post-thérapeutique par la recherche directe de la bactérie à distance du traitement ou un contrôle de non-recontamination à 4 à 6 mois. L'azithromycine aurait une moins bonne activité que la doxycycline sur les formes persistantes de la bactérie et sur les bactéries en portage anal.

Infections à *C. pneumoniae* et *C. psittaci*

In vitro, érythromycine et cyclines sont actives et constituent les traitements recommandés en première intention. Une durée prolongée (14 jours) est nécessaire.

Pour en savoir plus

de Barbeyrac B, Obeniche F, Peuchant O, et al. Méthodes de diagnostic des infections à chlamydiae : directes et/ou sérodiagnostic ? que choisir ? J Anti-infectieux 2014 ; 16 : 185–91.

de Barbeyrac B. *Chlamydia*. REMIC (Référentiel en microbiologie médicale). In : Société Française de Microbiologie. 5e éd. 2015.

Peuchant O, Cazanave C, de Barbeyrac B. Infections humaines à chlamydiae. In : Maladies Infectieuses. EMC, Paris : Elsevier Masson SAS ; 2012. 8-037-A-10.

www.microbes-edu.org/etudiant/etudiants.html.

36.2 *Coxiella burnetii*

S. Ranger-Rogez

Généralités

Coxiella burnetii est une bactérie intracellulaire obligatoire, seule espèce du genre *Coxiella*, famille des *Coxiellaceae* qui est classée à côté de la famille des *Legionellaceae* dans la sous-division γ des Protéobactéries. C'est un petit bacille ne pouvant pas être mis en évidence par la coloration de Gram, qui vit et se multiplie dans le phagolysosome des macrophages. *C. burnetii* présente une forme pseudosporulée responsable de sa très grande résistance en milieu extérieur et de son caractère très infectieux. Enfin, cette bactérie est sujette à une variation de phases : la forme présente dans l'environnement et hautement infectieuse est la phase I, alors qu'après culture, la bactérie modifie son lipopolysaccharide de paroi par délétion chromosomique et se présente sous une phase II antigéniquement différente et avirulente. *C. burnetii* est responsable de la fièvre Q, ainsi dénommée pour *query fever* (fièvre d'origine inconnue). Cette maladie est une zoonose présente dans le monde entier, sauf en Nouvelle-Zélande. Elle survient souvent mais non exclusivement chez des personnes au contact d'animaux, et peut se présenter sous une forme aiguë, généralement bénigne, ou sous une forme chronique, plus rare mais de pronostic médiocre.

Habitat et pouvoir pathogène

C. burnetii infecte de nombreux mammifères et marsupiaux qui constituent le principal réservoir. Parmi les animaux domestiques, ovins et caprins sont les principaux infectés, mais aussi bovins, lapins, chats et, dans une moindre mesure, chiens. La bactérie est également détectée chez les annélidés, les poissons, les reptiles, les oiseaux, certaines espèces de tiques (*Ixodes ricinus* principalement). Les arthropodes hématophages peuvent être réservoirs et vecteurs de cette bactérie. *C. burnetii* est peu pathogène chez les animaux, mais il a été montré qu'elle infecte les animaux d'élevage pour la vie entière. Étant localisée au niveau du placenta, elle occasionne cependant une prématurité, un faible poids de naissance, des avortements. La bactérie, excrétée dans les matières fécales, l'urine, le lait, est surtout présente en très grande quantité dans les produits de parturition qui, en se desséchant, laissent des bactéries toujours virulentes dans les fumiers, les litières, les poussières, etc. Elles sont ensuite répandues par le vent à grande distance et contaminent de manière intense et durable l'environnement.

L'homme se contamine principalement par inhalation de particules infectieuses, beaucoup plus rarement par ingestion de produits à base de lait cru. L'incubation dure de 1 à 3 semaines selon la voie d'inoculation et la charge bactérienne.

C. burnetii est hautement infectieuse et une seule bactérie peut occasionner une infection symptomatique.

La **fièvre Q aiguë** est asymptomatique dans 60 % des cas ; sinon, elle se manifeste par une fièvre prolongée, un syndrome pseudogrippal, une pneumopathie interstitielle sévère, ou une hépatite granulomateuse. Plus rarement, l'infection par *C. burnetii* est associée à une atteinte cardiaque (myocardite, péricardite), une glomérulonéphrite aiguë, une méningo-encéphalite ou une méningite, une éruption fébrile. L'infection est en général spontanément résolutive chez un sujet immunocompétent. Chez la femme enceinte, elle peut provoquer une placentite (il a été montré que *C. burnetii* peut infecter les trophoblastes) conduisant à une prématurité, un avortement, une mort fœtale in utero ; l'infection devient très souvent chronique dans ce contexte.

La **fièvre Q chronique**, définie comme la persistance de l'infection pendant une période de plus de 6 mois, survient dans 2 à 5 % des cas d'infection aiguë, et principalement en cas d'immunodépression ou sur un terrain favorable. Elle est essentiellement responsable d'endocardites chez les valvulopathes (60 % des cas), d'infections vasculaires sur prothèses ou sur anévrisme, plus rarement d'ostéomyélite, d'hépatite, d'infection pulmonaire chronique, de fibrose pulmonaire. Le pronostic en est médiocre (mortalité de 5 à 60 % des cas). Chez les femmes enceintes, la fièvre Q chronique est fréquemment responsable de prématurité, de mortinatalité et de fausses couches à répétition.

Vu la résistance de la bactérie (sous forme de « pseudospore »), sa possible propagation aérienne et la porte d'entrée

respiratoire, *C. burnetii* est un agent microbien pouvant intéresser le bioterrorisme.

Caractères généraux d'orientation et de différenciation du genre

C. burnetii est une bactérie pléomorphe de 0,2 à 1 µm, intracellulaire stricte. Sa structure est proche de celle des bactéries à Gram négatif et elle prend bien la coloration historique de Gimenez. Elle existe sous deux formes morphologiquement distinctes : LCV pour *large cell variant*, et SCV pour *small cell variant*. Cette dernière forme constitue une pseudospore particulièrement résistante trouvée dans le milieu extérieur. Pour inactiver la bactérie, il faudra utiliser l'une des solutions suivantes : NaOH chaude à 2 %, phénol à 5 %, chloroforme à 5 %, alcool éthylique à 70 %, formol à 2 %, peroxyde d'hydrogène à 5 %.

Diagnostic bactériologique

Le diagnostic est le plus souvent réalisé de manière indirecte par mise en évidence des anticorps. Il est parfois nécessaire d'y adjoindre des méthodes directes, notamment chez des sujets immunodéprimés ou en fonction de la symptomatologie.

Diagnostic direct

Le diagnostic direct est rarement réalisé, du fait du caractère hautement infectieux de la bactérie. Il est essentiellement pratiqué dans des laboratoires spécialisés.

Prélèvements

Il peut s'agir de biopsies (hépatiques, pulmonaires), de prélèvements chirurgicaux (valves, prothèses), de placenta, de sang, de lait.

Examen direct

La bactérie est difficilement observable après coloration de Gram. La coloration la plus intéressante pour visualiser *C. burnetii* dans un produit pathologique est la coloration de Gimenez, utilisant la fuchsine basique. Les bactéries apparaissent sous forme de coccobacilles rouges situés dans des vacuoles intracytoplasmiques. Les colorations de Stamp ou de Macchiavello peuvent aussi être utilisées.

Ces diverses colorations sont cependant peu sensibles et non spécifiques (elles permettent aussi de visualiser des *Chlamydiae* ou des *Brucellae*), et il est préférable de mettre en évidence *C. burnetii* sur des tissus après apposition ou sur des coupes histologiques par immunohistochimie (immunofluorescence ou immunoperoxydase) à l'aide d'anticorps spécifiques ou par hybridation in situ fluorescente à l'aide d'une sonde marquée. Cependant, il n'existe actuellement pas d'anticorps ni de sondes commerciaux; c'est pourquoi ces techniques ne sont réalisées que dans les centres de référence.

Culture

La culture de *C. burnetii* est rarement pratiquée car elle est peu sensible et fait encourir des risques pour le personnel (elle doit être pratiquée dans un laboratoire de niveau 3). Cette bactérie intracellulaire stricte est cultivée selon des techniques qui s'apparentent à celles utilisées pour la culture des virus. Elle peut s'effectuer sur des œufs embryonnés, ce qui est actuellement abandonné pour le diagnostic, mais le plus souvent la culture est réalisée sur cellules, comme les cellules diploïdes HEL 299 dérivées de tissu pulmonaire embryonnaire humain, ou sur cellules CHO (*Chinese hamster ovary*) ou BHK21 (*baby hamster kidney*). La culture consiste à inoculer par centrifugation à 700 g/min pendant 1 heure à 20 °C une nappe confluente de cellules cultivées sur des lamelles déposées au fond de puits de plaques stériles ou de tubes bijoux. Cette étape vise à favoriser l'attachement et la pénétration des bactéries dans les cellules. Après centrifugation, le milieu est retiré et remplacé par du milieu de culture cellulaire et l'incubation est poursuivie à 37 °C sous 5 % de CO_2. La détection de la croissance bactérienne est réalisée après 5 à 7 jours, directement sur la lamelle ou après grattage et recueil des cellules qui sont alors déposées sur lame. Cette détection est effectuée par coloration de Gimenez ou par immunofluorescence à l'aide d'anticorps spécifiques (Fig. 36.3), plus rarement par PCR.

Récemment, il a été décrit la possibilité de cultiver *C. burnetii* en milieu ACCM-2 (*acidified citrate cysteine medium*), dépourvu de cellules, en présence de 2,5 % d'O_2 en 6 jours. L'acidité du milieu et la faible oxygénation recréent une ambiance comparable à celle des vacuoles cellulaires.

La culture n'est pas utilisée à des fins diagnostiques, mais a pour but d'obtenir des souches qui seront ensuite étudiées sur un plan épidémiologique, quant à leur virulence ou leur sensibilité aux antibiotiques.

Amplification génique (PCR)

C'est la technique la plus spécifique pour poser le diagnostic d'infection à *C. burnetii*, mais sa sensibilité est encore controversée. Elle peut être réalisée sur tout type de prélèvement et est très utile lorsqu'elle est appliquée à une valve cardiaque en cas d'endocardite. Chez les patients atteints d'endocardite ou d'infection vasculaire, la PCR sérique est aussi positive pendant une longue période.

Récemment, il a été montré que la PCR sérique peut être positive durant les premiers jours d'une infection aiguë (jusqu'au 17e jour au plus tard) et qu'elle se négative progressivement avec l'apparition séquentielle des anticorps (Tableau 36.4).

Il n'existe pas de réactifs commerciaux pour détecter la présence du génome de *C. burnetii* dans un prélèvement et diverses techniques ont été publiées, les plus récentes permettant la quantification (PCR en temps réel). Divers gènes

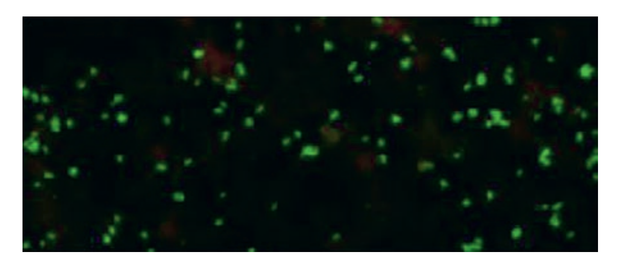


Fig. 36.3 Aspect de *Coxiella burnetii* à l'examen direct d'un produit pathologique en immunofluorescence.

Tableau 36.4 **Présence de *C. burnetii* dans le sérum (détection par PCR) en fonction de la sérologie au cours d'une infection aiguë.**

Ig et phases	Sérologie				
IgM phase II	–	+	+	+	+
IgG phase II	–	–	+	+	+
IgM phase I	–	–	–	+	+
IgG phase I	–	–	–	–	+
Taux de positivité de la PCR	49/50 (98 %)	9/10 (90 %)	3/13 (23 %)	2/41 (5 %)	0/1 (0 %)

(D'après Schneeberger PM et al., Clinical and Vaccine Immunology 2010 ; 17 : 286–90.)

peuvent servir de matrice, mais il est important de vérifier la spécificité de l'amplification par une hybridation ou par séquençage du produit amplifié. Les gènes utilisés comme cibles peuvent être plasmidiques (*QpH1*, *QpRS*) ou chromosomiques, comme le gène de l'isocitrate déshydrogénase, ou comme les éléments d'insertion *IS1111a*, cible la plus utilisée, ou *IS30a*. L'intérêt de choisir comme cible un élément d'insertion est qu'il en existe plusieurs copies par génome bactérien (7 à 120 copies pour *IS1111a* selon les souches, 20 copies pour la souche de référence Nine Mile), ce qui permet d'augmenter la sensibilité de la détection. Cependant, les amorces et sondes doivent être choisies avec soin, car la comparaison des séquences d'*IS1111a* chez diverses souches a montré un important polymorphisme.

Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Comme *C. burnetii* n'est pas cultivable sur des milieux inertes, la recherche de la sensibilité aux antibiotiques n'est pas réalisée couramment. Elle est seulement pratiquée par quelques laboratoires spécialisés qui travaillent sur des cultures cellulaires infectées. Récemment, la recherche par PCR puis séquençage de mutations associées à des résistances a été décrite, mais cette technique n'en est pour l'instant qu'à ses débuts.

Diagnostic indirect : sérodiagnostic

C'est la méthode la plus couramment utilisée pour poser le diagnostic d'infection à *C. burnetii*. Trois techniques sont principalement utilisées : la réaction d'immunofluorescence indirecte (IFI) qui est la technique de référence, la réaction de fixation du complément à coupler avec la PCR et la technique ELISA.

L'IFI utilise comme antigène *C. burnetii* souche Nine Mile qui présente des antigènes de phase II lorsqu'elle est cultivée sur cellules, et des antigènes de phase I lorsqu'elle est prélevée sur des rates de souris infectées. Lors de l'infection aiguë, la réponse humorale IgG est dirigée principalement contre les antigènes de phase II, alors qu'une infection établie se manifeste par la présence d'IgG de titre élevé dirigées contre la phase I. Pour un simple dépistage, il est inutile de rechercher la réponse vis-à-vis des antigènes de phase. Le dépistage peut donc être effectué sur des lames présentant une seule phase de *C. burnetii* (phase II en l'occurrence) ; il existe des réactifs commerciaux, comme les lames *Coxiella burnetii* IFA IgG® ou IgM vendues par Vircell. La présence d'IgM ou d'IgA sera recherchée après élimination du facteur rhumatoïde. Une réaction positive se manifestera, à l'observation au microscope en lumière ultraviolette, par la présence de très nombreuses bactéries fluorescentes réparties sur la totalité du puits et sur les lambeaux de tissus (Fig. 36.4). Chaque fabricant conseille des dilutions de dépistage et donne une valeur seuil significative. Cependant, il a été montré que les résultats obtenus varient grandement selon les populations étudiées et l'environnement. C'est pourquoi il est conseillé pour chaque laboratoire d'établir son propre seuil de significativité en testant des sérums de sujets sains, des sérums de patients ayant fait une fièvre Q avérée et des sérums de sujets ayant une infection connue pour donner des réactions sérologiques croisées avec *C. burnetii* (*Leptospira*, *Legionella*). La valeur seuil est le titre immédiatement supérieur au titre obtenu pour 98 % des sérums des sujets sains. Récemment, plusieurs auteurs ont préconisé de définir une zone grise située 2 dilutions en dessous de la valeur seuil. Les patients dont les sérums donnent un titre dans cette zone grise, devraient être prélevés 2 semaines plus tard pour contrôle. À titre d'exemple, le tableau 36.5 donne les résultats obtenus par un laboratoire danois utilisant des lames commerciales.

Lorsque le test de dépistage est positif, le sérum doit ensuite être étudié pour les deux phases antigéniques (phases I et II). Des lames commerciales existent qui présentent la particularité d'avoir sur chaque puits deux petits dépôts, l'un correspondant à la bactérie en phase I et l'autre

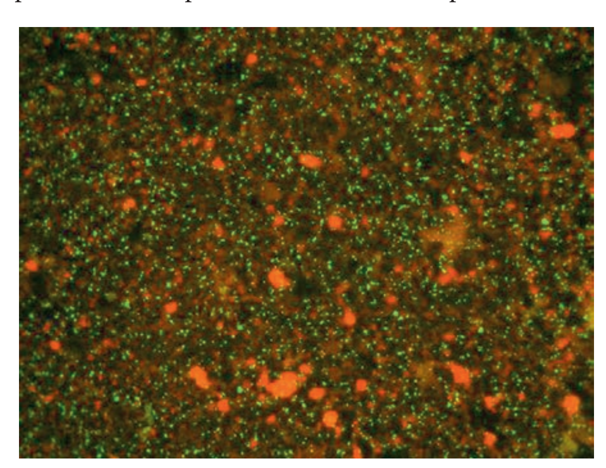


Fig. 36.4 **Aspect obtenu pour une sérologie fièvre Q positive par immunofluorescence indirecte.** Les bactéries apparaissent fluorescentes et les lambeaux cellulaires sont colorés en rouge.

Tableau 36.5 **Exemple de choix d'une valeur seuil et d'une zone grise pour le test sérologique par immunofluorescence Focus Diagnostics® sur une population danoise.**

	Négatif	Zone grise	Positif
IgM phase I	< 64	64	≥ 128
IgM phase II	< 64	64–128	≥ 256
IgG phase I	< 128	128–256	≥ 512
IgG phase II	≤ 128	256–512	≥ 1024

(D'après Villumsen S et al., Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2009 ; 65 : 93–8.)

à la bactérie en phase II (kits vendus par Eurobio ou par Focus Diagnostics). Les IgG, IgM et dans certains cas les IgA sont recherchées et quantifiées pour ces phases. En cas de positivité, l'aspect observé au microscope est le même que précédemment décrit. La lecture est parfois rendue difficile du fait de la petite taille des dépôts antigéniques.

La réaction de fixation du complément est une technique très spécifique mais moins sensible et de réalisation longue. Elle est de moins en moins utilisée.

Il existe aussi des tests commerciaux utilisant la technique ELISA (SERION ELISA classic *Coxiella burnetii* IgG/IgM® vendues par Virion/Serion, par exemple). Ces tests semblent avoir une sensibilité plus faible que l'IFI. La difficulté d'établir une valeur seuil avec ces techniques explique aussi la présence de faux positifs. La plupart des auteurs s'accordent pour recommander ces tests pour des études séro-épidémiologiques plutôt que dans un but diagnostique.

Interprétation du diagnostic sérologique de la fièvre Q (IFI)

Fièvre Q aiguë

Le diagnostic de fièvre Q aiguë est préférentiellement posé devant l'augmentation du titre des IgG de plus de deux dilutions sur deux sérums prélevés à 15 jours d'intervalle ou sur une séroconversion des IgG. Celle-ci s'observe classiquement 7 à 15 jours après le début des symptômes; 90 % des patients présentent des IgG 3 semaines après le début des manifestations cliniques.

Les IgM apparaissent vers 2 semaines et disparaissent en général au cours des 4 mois suivant l'infection. Ils peuvent cependant rester positifs longtemps (jusqu'à 17 semaines).

Mais, le plus souvent, le biologiste dispose d'un seul sérum pour effectuer le diagnostic de l'infection aiguë. Dans ce cas, le diagnostic de fièvre Q aiguë est posé devant la présence d'un titre élevé des IgG dirigées contre la bactérie en phase II avec des IgG de phase I faibles ou inexistantes, en présence d'IgM de phase I et/ou II (Fig. 36.5).

Fièvre Q chronique

Le diagnostic de fièvre Q chronique est posé devant la présence d'IgG anti-phase I de titre élevé (≥512 ou 640 ou plus), quelle que soit la valeur des IgG de phase II (Fig. 36.6). Les valeurs observées sont souvent très élevées. Le titre retenu comme significatif d'infection chronique pourra varier avec la technique utilisée et selon le contexte épidémiologique

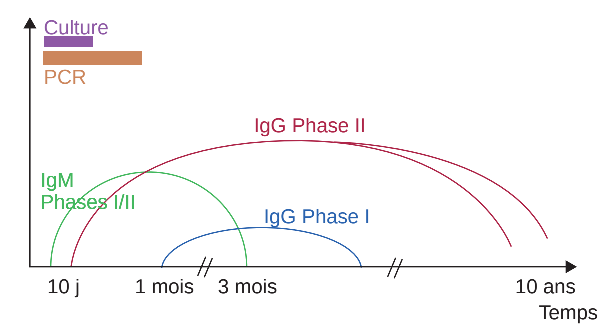


Fig. 36.5 **Évolution des différents marqueurs au cours de la fièvre Q aiguë.**

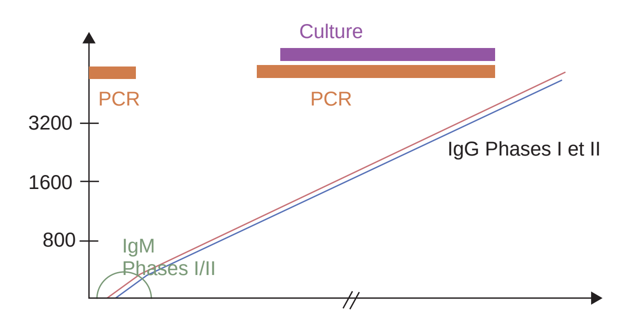


Fig. 36.6 **Évolution des différents marqueurs au cours de la fièvre Q chronique.**

régional. Des IgM anti-phase I sont en général présentes et assez fréquemment des IgM de phase II sont détectées. Des IgA anti-phase I de titre élevé sont souvent présentes. Leur suivi peut être intéressant, car elles disparaissent beaucoup plus rapidement que les IgG au cours de la guérison.

La surveillance sérologique des patients atteints de fièvre Q chronique et traités doit être mensuelle au début, puis tous les 4 à 6 mois. Sous traitement efficace, le taux des anticorps diminue lentement et la surveillance doit être effectuée pendant toute la durée du traitement, soit 18 mois à 3 ans en général, puis un contrôle annuel sera mis en place. Ces patients présentent le plus souvent des valeurs élevées résiduelles des IgG anti-phase I.

Conclusion

Le diagnostic de l'infection par *C. burnetii* repose encore actuellement essentiellement sur la sérologie qui reste parfois d'interprétation délicate. Les nombreuses réactions croisées décrites n'interfèrent pas avec le diagnostic dès lors que celui-ci utilise le titrage des anticorps dirigés contre les différentes phases de la bactérie.

Pour en savoir plus

De Silva T, Chapman A, Kudesia G, et al. Ongoing queries : interpretation of serology in asymptomatic or atypical chronic Q fever. J Infection 2006; 52 : e113. e6.

Haut Conseil de la Santé Publique. Fièvre Q : recommandations de prise en charge; 2013.

Kazar J. Coxiella burnetii infection. Ann NY Acad Sci 2005; 1063 : 105–14.

Million M, Raoult D. Recent advances in the study of Q fever : epidemiology, diagnosis and management. J Infect 2015; 71(Suppl 1) : S2–9.

Omsland A, Hackstadt T, Heinzen RA. Bringing culture to the uncultured : Coxiella burnetii and lessons for obligate intracellular bacterial pathogens. PLOS Pathog 2013; 9(9). e1003540.

Parker NR, Barralet JH, Bell AM. Q fever. Lancet 2006; 367 : 679–88.

Stein A. Coxiella burnetii. In : Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, editors. Précis de bactériologie clinique. 2e éd. Paris : ESKA; 2007. p. 1623–30.

Adresse utile

Centre national de référence, unité des rickettsies
Faculté de Médecine
27, boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille cedex 5
Tél. : 04 91 32 43 75 – Fax : 04 91 38 77 72

36.3 Rickettsies – *Rickettsia conorii*

S. Ranger-Rogez

Généralités

Les rickettsies sont de petites bactéries à développement intracellulaire obligatoire, transmises à l'homme par des vecteurs; les rickettsioses sont responsables de zoonoses. Ces bactéries sont classées dans la famille des *Rickettsiaceae*, tribu des *Rickettsiae*, et leur classification qui était initialement fondée sur des caractères essentiellement phénotypiques a été modifiée à la lumière des résultats obtenus par séquençage notamment du gène de l'ARN ribosomal 16S. Il existe deux genres bactériens : *Rickettsia* et *Orientia*.

Les *Rickettsiae* sont classées en deux grands groupes :

- le groupe du typhus épidémique comprenant :
  - *R. prowazeckii* agent du typhus exanthématique;
  - *R. typhi*, agent du typhus murin.
- le groupe des fièvres boutonneuses comprenant plus de 20 espèces pouvant infecter l'homme, dont :
  - *R. rickettsii*, responsable de la fièvre pourprée des montagnes Rocheuses;
  - *R. conorii*, comprenant maintenant quatre sous-espèces, sévissant dans des régions différentes et pouvant donner des pathologies différentes : *R. conorii conorii*, responsable de la fièvre boutonneuse méditerranéenne, *R. conorii caspia*, *R. conorii israelensis*, *R. conorii indica*.

Par ailleurs, *R. canadensis* et *R. bellii* sont considérées comme un groupe « ancêtre », et *R. akari*, *R. australis* et *R. felis* constituent un groupe de transition.

Le genre *Orientia* comprend une seule espèce : *O. tsutsugamushi*.

Ces dernières années ont vu la découverte de nouvelles espèces de rickettsies, certaines ayant un potentiel pathogène pour l'homme. Les rickettsies sont ainsi considérées comme « pathogènes émergents ». La grande résistance dans le milieu extérieur de ces germes pathogènes pour l'homme les fait considérer comme agents potentiels de bioterrorisme.

Toutes les rickettsies sont transmises par des vecteurs et sont capables d'infecter l'homme. Si les bactéries du groupe typhus, transmises par le pou de corps (*R. prowazekii*) ou par la puce du rat (*R. typhi*), ont joué un rôle historique très important, notamment en période de guerre, elles ne sont actuellement trouvées que dans les pays de faible niveau socio-économique. Cependant, *R. typhi* serait la rickettsie la plus fréquemment acquise par les voyageurs. Elle se manifeste le plus souvent comme une fièvre indifférenciée et le diagnostic est rarement effectué. Les bactéries du groupe des fièvres boutonneuses sont transmises par des tiques, qui sont vecteurs et réservoirs, et leur répartition géographique est le reflet de celle de leur vecteur. La répartition saisonnière de la maladie est le reflet du cycle de l'espèce de tique. L'espèce trouvée fréquemment en France est *R. conorii* qui est responsable de la fièvre boutonneuse méditerranéenne, et une place plus importante lui sera réservée dans ce chapitre. Les autres rickettsies occasionnellement pathogènes en France (Tableau 36.6) seront abordées plus rapidement.

Quant à *O. tsutsugamushi*, elle occasionne le typhus des broussailles, maladie endémique dans l'Est du continent asiatique et l'Ouest du Pacifique.

Habitat et pouvoir pathogène

Les rickettsies sont cosmopolites et infectent de nombreux animaux qui constituent un réservoir naturel. Elles infectent aussi de nombreux arthropodes qui peuvent être vecteurs, réservoirs (et dans certains cas amplificateurs). La plupart du temps, l'homme n'est qu'un hôte accidentel. Les arthropodes interviennent dans la transmission interanimale, de

Tableau 36.6 **Principales caractéristiques des pathologies associées à des rickettsies en France.**

Espèce	Vecteur	Particularités cliniques	Région	Pathologie associée
*R. conorii**	*Rhipicephalus sanguineus* *Rhipicephalus bursa*	Uvéite	Pourtour méditerranéen Europe centrale Afrique	Fièvre boutonneuse méditerranéenne (MSF)
*R. sibirica mongolitimonae**	*Hyalomma asiaticum* *H. anatolicum*	Lymphangite (50 % cas)	Asie, Europe, Afrique subsaharienne	LAR
*R. slovaca/R. raoultii/R. Rioja**	*Dermacentor marginatus* *D. reticulatus*	Lymphadénopathie	France, Suisse, Slovaquie	TIBOLA/DEBONEL/SENLAT
*R. helvetica**	*Ixodes ricinus*	Symptômes variés Atteinte cardiaque	Europe	Fièvre boutonneuse
*R. aeschlimannii**	*Hyalomma* spp.		Corse	Fièvre boutonneuse
*R. africae***	*Amblyomma variegatum* *A. hebraeum*		Afrique, Antilles, Réunion	Fièvre à tiques africaine
*R. rickettsii***	*A. cajennense*		Amérique centrale et du Nord, Guyanne	Fièvre pourprée des montagnes Rocheuses

* France métropolitaine;
** DOM-TOM.
LAR : *lymphangitis associated rickettsioses*; DEBONEL : *dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy*; MSF : *Mediterranean spotted fever*; SENLAT : *scalp eschar and neck lymphadenopathy*; TIBOLA : *tick-borne lymphadenopathy.*

l'animal à l'homme ou interhumaine. Il n'existe pas de transmission interhumaine directe.

R. conorii est répartie dans le pourtour méditerranéen, en Europe centrale et en Afrique. En France, on trouve *R. conorii* dans les régions méridionales, le couloir rhodanien, en Bourgogne, Franche-Comté, Lorraine. Il est admis que le réservoir et vecteur est la tique du chien *Rhipicephalus sanguineus* qui a une répartition mondiale; son taux d'infection dans la nature est habituellement très faible. Les rongeurs sauvages (lapins, hérissons) pourraient, quant à eux, constituer un deuxième réservoir, mais cette hypothèse est controversée. L'homme comme le chien sont des hôtes accidentels. La maladie sévit essentiellement à la fin du printemps, en été et au début de l'automne. D'importantes variations dans l'incidence de cette maladie sont observées selon les années, probablement en relation avec les variations climatiques et donc l'activité des tiques. Une augmentation du nombre de cas cette dernière décennie et une augmentation du nombre de pays rapportant cette infection sont peut-être à corréler à un meilleur diagnostic, en particulier par utilisation de la biologie moléculaire.

Les rickettsies sont transmises par voie cutanée ou conjonctivale et pénètrent dans la circulation sanguine. Elles infectent les cellules endothéliales des vaisseaux et s'y multiplient, l'infection débutant au site d'inoculation. Les cellules infectées desquament, altérant les propriétés antithrombotiques de l'endothélium vasculaire et favorisant l'adhérence des plaquettes, l'ensemble étant à l'origine de lésions de vascularite.

Les manifestations cliniques associées aux rickettsies sont des tableaux fébriles généralement exanthématiques, d'incubation moyenne de 6 à 10 jours. Un syndrome pseudogrippal d'installation brutale, pouvant durer plusieurs semaines et pouvant conduire jusqu'à un état de prostration, précède l'apparition de l'éruption cutanée maculeuse, maculopapuleuse, ou vésiculeuse, qui débute souvent vers le 5e jour d'évolution, localisée au tronc, et pouvant se généraliser. La découverte d'une escarre d'inoculation (absente dans la fièvre pourprée des montagnes Rocheuses) oriente le diagnostic vers une rickettsiose. De graves complications peuvent survenir : défaillance rénale, purpura fulminans, pneumopathie sévère, gangrène, etc., et ce d'autant plus que le délai de mise en œuvre du traitement sera long.

La fièvre boutonneuse méditerranéenne répond au tableau précédent. L'éruption cutanée maculopapuleuse survient très fréquemment au niveau du tronc ou des membres, se généralise en épargnant la face, et s'accompagne d'une thrombocytopénie et d'une élévation des transaminases. Une escarre au site d'inoculation est retrouvée dans plus de 70 % des cas; il est possible d'observer plusieurs escarres. L'évolution est spontanément favorable. Les lésions de vascularite affectant le rein et d'autres organes sont à l'origine des formes sévères survenant sur des terrains particuliers et pouvant aboutir à un syndrome de défaillance multiviscérale. La mortalité rapportée initialement était de 1 à 3 %. Cependant, il semble que la maladie devienne plus sévère et des variations sont observées selon les années et selon les régions, le taux de mortalité maximal rapporté étant de 32,3 % au Portugal, chez des patients hospitalisés. Les facteurs de risque de faire une forme grave sont : l'âge, l'immunodépression, l'alcoolisme chronique, un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase, un retard à la mise en route d'un traitement approprié, le diabète, le tabagisme.

Outre le tableau fébrile exanthématique retrouvé communément dans les infections par les rickettsies, une lymphangite est fréquemment associée à l'infection par *R. sibirica mongolitimonae*, alors que *R. slovaca*, *R. raoultii* et *R. rioja* sont à l'origine d'un syndrome dénommé TIBOLA pour *tick-borne lymphadenopathy*, ou DEBONEL pour *dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy*, et rebaptisé plus récemment SENLAT pour *scalp eschar and neck lymphadenopathy*, associant souvent une escarre crânienne et une lymphadénopathie cervicale. *R. helvetica* a été associée à une atteinte cardiaque.

Caractères généraux d'orientation et de différenciation du genre

Les rickettsies sont de petits bacilles intracellulaires, de 0,3 à 2,5 µm de longueur, prenant mal la coloration de Gram, bien que la composition de leur paroi soit proche de celle des bactéries à Gram négatif. Elles sont entourées d'un glycocalyx. Elles sont colorées par la coloration de Gimenez ou par la coloration de Giemsa. Leur multiplication intracellulaire stricte s'effectue par scissiparité. Les rickettsies du groupe boutonneux s'individualisent par le fait qu'elles peuvent être observées dans le noyau et le cytoplasme des cellules et que leur température optimale de croissance est de 32 °C. Les autres rickettsies sont de localisation exclusivement cytoplasmique et leur température de croissance est de 35 °C.

Diagnostic bactériologique

Le diagnostic est en général un diagnostic indirect qui ne permet pas de connaître précisément l'espèce en cause. La positivité du diagnostic direct pose le diagnostic.

Diagnostic direct

Les rickettsies sont classées dans le groupe 3 des agents infectieux et doivent être manipulées en laboratoire de sécurité de niveau 3 sous PSM. Ce diagnostic est essentiellement pratiqué dans des laboratoires spécialisés.

Prélèvements

Le meilleur prélèvement pour porter un diagnostic direct d'infection par une rickettsie du groupe boutonneux est une biopsie cutanée au niveau de l'escarre d'inoculation ou d'une éruption. Le diagnostic peut aussi être réalisé, mais avec une moindre sensibilité, sur un prélèvement sanguin ou à partir d'une tique.

Examen direct

Les rickettsies sont difficilement observables par les colorations classiques utilisées en bactériologie. Le meilleur moyen de les mettre en évidence est d'utiliser une technique immunohistochimique (par exemple sur le prélèvement d'escarre pour une rickettsie du groupe boutonneux), à

condition de posséder des anticorps spécifiques du germe. Comme il n'existe actuellement pas d'anticorps commercialisés, cette technique est réalisée uniquement dans les centres de référence.

Culture

La culture des rickettsies, qui constitue la technique de référence, ne peut pas être réalisée sur des milieux synthétiques. Ces bactéries sont cultivées sur œuf embryonné ou sur culture de cellules eucaryotes (HEL, cellules endothéliales, cellules Vero, etc.). La sensibilité de la technique peut être augmentée par centrifugation du prélèvement sur la culture des cellules en microplaques. En culture cellulaire, ces bactéries produisent rapidement (en 3 à 5 jours) un effet cytopathique se manifestant par de larges plages de lyse. Elles sont ensuite mises en évidence par coloration de Gimenez, en immunofluorescence ou, le plus souvent, après amplification génique. La sensibilité de la technique est de l'ordre de 60 % dans les premiers jours de la maladie et seulement de 10 % lorsque les anticorps sont apparus (Fig. 36.7).

Amplification génique (PCR)

Cette technique a une sensibilité d'environ 70 %. Elle peut être réalisée sur tout type de prélèvement. Il n'existe pas de réactifs commerciaux et les techniques publiées utilisent un nombre restreint de gènes cibles comme les gènes codant la sous-unité 16S de l'ARNr, la protéine de 17 kDa, la citrate synthase, rOmpA, rOmpB, Sca4. Il existe des PCR spécifiques du genre *Rickettsia* et d'autres spécifiques d'espèces. L'identification précise de l'espèce, en particulier pour des espèces génétiquement proches, peut aussi être réalisée après séquençage.

Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Cette étude n'est pas réalisée en pratique courante car ces bactéries ne cultivent pas sur milieux synthétiques. Le traitement repose sur une antibiothérapie utilisant des molécules à pénétration intracellulaire (cyclines, rifampicine, érythromycine, ciprofloxacine).

Diagnostic indirect : sérodiagnostic

C'est la méthode la plus utilisée pour effectuer un diagnostic d'infection par une rickettsie. La technique historique de Weil et Félix était une technique d'agglutination utilisant une communauté antigénique existant entre les antigènes rickettsiens et les antigènes OX2, OX19 et OXK de trois souches de *Proteus*. Cette technique n'est plus utilisée actuellement dans les pays développés et c'est la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI), très sensible (> 97 %) et spécifique (> 99 %), qui fait référence. Il est à noter qu'il existe des communautés antigéniques importantes entre les différentes rickettsies d'un même groupe, entraînant des réactions croisées. Les tests ELISA commerciaux ont de faibles sensibilité et spécificité. Pour différencier les anticorps entre les différents membres du groupe des fièvres boutonneuses, un immunotransfert (*Western-blot*) peut être réalisé avec préabsorption des anticorps.

Il est actuellement possible d'utiliser des lames du commerce pour la recherche d'anticorps anti-*Rickettsia conorii* par IFI (Vircell). *R. conorii* souche marocaine ATCC VR-141 cultivée sur cellules Vero et inactivée constitue l'antigène. Le dépistage des IgG est effectué après dilution du sérum au 1/40e. La présence d'IgM est recherchée après élimination du facteur rhumatoïde. La réaction est considérée comme étant positive lorsqu'on observe au microscope en lumière ultraviolette la présence de nombreuses bactéries fluorescentes intra- et extracellulaires. Il est possible de titrer les IgG par dilutions successives du sérum, le titre retenu étant l'inverse de la plus forte dilution donnant encore une réaction positive. Des titres ≥ 80 en IgG associés à la présence d'IgM, ou une multiplication par 4 du titre des IgG entre deux sérums consécutifs distants d'au moins 15 jours, sont considérés comme significatifs d'infection récente par *R. conorii* ou éventuellement une autre rickettsie du groupe boutonneux. Les anticorps apparaissent en moyenne respectivement en une quinzaine de jours pour les IgM et environ 3 semaines pour les IgG après l'infection. En cas de sérologie de dépistage négative, un deuxième sérum sera prélevé 15 jours plus tard afin de rechercher une séroconversion IgG. Le même

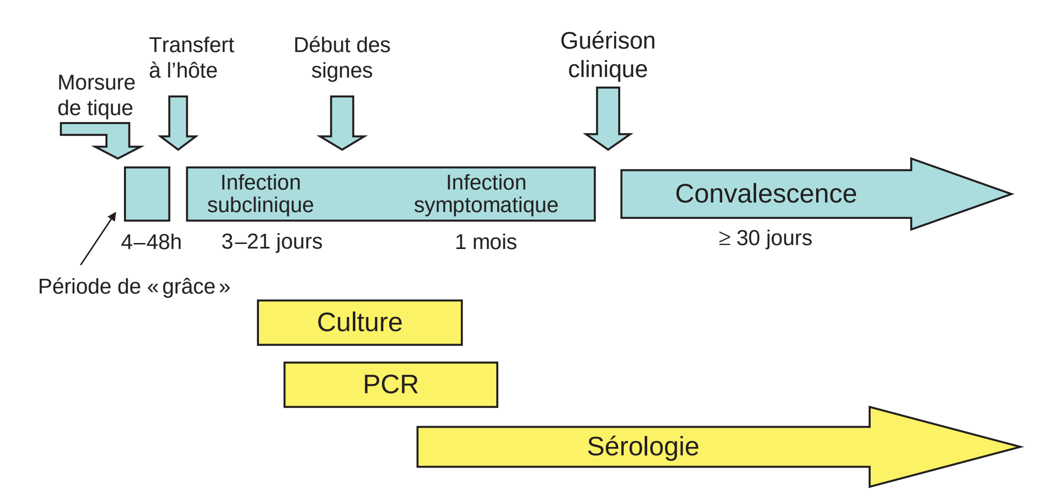


Fig. 36.7 Diagnostic d'infection par une rickettsie. Les différentes techniques microbiologiques utilisables pour porter un diagnostic en fonction de l'évolution des signes cliniques. *(D'après Nicolson WL, Allen KE, MC Quiston JH, et al. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. Trends in Parasitology 2010 ; 26 : 205–12.)*

fabricant commercialise un ELISA permettant la détection des IgG et des IgM.

Afin de connaître plus précisément quelle rickettsie du groupe boutonneux est en cause, il est possible d'envoyer le sérum au centre de référence où est pratiquée une technique d'IFI vis-à-vis des rickettsies suivantes :

- *R. conorii*, *R. slovaca*, *R. helvetica*, de manière systématique;
- *R. mongolotimonae*, *R. massiliae*, *R. israeli* si le patient a subi une morsure de tique en Europe;
- *R. africae*, *R. akari*, *R. aeschlimanii* et *R. massiliae* seront en outre testées si la morsure de tique est survenue en Afrique.

La rickettsie incriminée sera celle donnant le plus fort taux d'anticorps en IFI ou pour laquelle la présence d'anticorps spécifiques aura été mise en évidence par immunotransfert, qui permet en outre de porter un diagnostic plus précoce. Enfin, le plus fort taux d'anticorps obtenu après adsorption croisée permet aussi d'effectuer le diagnostic.

Une technique d'IFI peut également être réalisée sur des lames sensibilisées par *R. typhi* (non commercialisées), et l'interprétation est similaire, permettant de conduire au diagnostic d'infection par cette bactérie ou par une autre bactérie du groupe typhus.

Conclusion

Le diagnostic d'infection par une rickettsie reste, le plus souvent, un diagnostic sérologique. Il n'est pas de réalisation courante dans notre pays, d'autant plus que seule *R. conorii* est régulièrement impliquée en pathologie humaine, essentiellement dans les régions méridionales.

Pour en savoir plus

Eremmeva ME, Dasch GA. Challenges posed by tick-borne rickettsiae : eco-epidemiology and public health implications. Front Public Health 2015; 3(55) : 1–17.

Hechemy KE, Raoult DA, Silverman DJ, et al. Century of rickettsiology : emerging, reemerging, rickettsioses, molecular diagnostics, and emerging veterinary rickettsioses. Ann NY Acad Sci 2006; 1078 : .

Hechemy KE, Oteo JA, Raoult DA, et al. Rickettsioses : from genome to proteome, pathobiology, and rickettsiae as an international threat. Ann NY Acad Sci 2005; 1063.

Oteo JA, Portillo A. Tick-borne rickettsioses in Europe. Ticks and tick-borne diseases 2012; 3 : 270–7.

Rovery C, Brouqui P, Raoult D. Questions on Mediterranean spotted fever a century after its discovery. Emerg Infect Dis 2008; 14(9) : 1360–7.

Adresse utile

Centre national de référence, unité des Rickettsies
Faculté de Médecine
27, boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille cedex 5
Tél. : 04 91 32 43 75 – Fax : 04 91 38 77 72

36.4 *Ehrlichia – Anaplasma*

S. Ranger-Rogez

Généralités

L'étude de l'analyse des séquences géniques et plus particulièrement celle de la fraction 16S de l'ARN ribosomal des bactéries a profondément modifié la classification de certaines espèces bactériennes. Le groupe des *Ehrlichia* est actuellement classé dans la famille des *Anaplasmataceae*, ordre des *Rickettsiales* (α-protéobactéries) et divisé en quatre genres : *Ehrlichia* et *Anaplasma* associés aux tiques, *Neorickettsia* associé aux helminthes, et *Wolbachia* associé aux arthropodes et aux helminthes. Ces bactéries intracellulaires strictes occasionnent des maladies animales, notamment chez le chien, et humaines, dues à l'infection de cellules sanguines. Les deux maladies les plus connues chez l'homme sont :

- l'ehrlichiose monocytaire humaine (*human monocytosis erhlichiosis* [HME]);
- l'anaplasmose granulocytaire humaine (*human granulocytic anaplasmosis* [HGA]).

Les infections humaines par les bactéries de cette famille ont été décrites initialement en 1953 avec l'espèce *Neorickettsia sennetsu*, puis en 1986 avec l'espèce *Ehrlichia chaffeensis*, et finalement en 1990 pour *Anaplasma*. Les principales espèces pathogènes pour l'homme sont répertoriées dans le tableau 36.7. Depuis leur découverte et depuis le développement d'outils diagnostiques performants, les *Ehrlichia* sont apparues comme émergentes en pathologie humaine.

Habitat et pouvoir pathogène chez l'homme

Les ehrlichioses et anaplasmoses sont transmises d'un réservoir animal à l'homme par morsure d'une tique « dure » et leur répartition géographique est celle de leur vecteur. Les infections surviennent en période printanière et estivale. La médiane d'âge est d'environ 50 ans et 60 % des patients sont des hommes. Certaines de ces infections ne sont décrites qu'aux États-Unis (infections provoquées par *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. canis*). De rares infections à *E. chaffeensis* auraient été documentées sérologiquement en Amérique du Sud, en Europe (bien que l'espèce de tique transmettant cette bactérie n'y soit pas présente) et dans certains pays d'Asie, mais les tests utilisés manquaient de spécificité.

En revanche, *A. phagocytophilum* est trouvée aussi bien aux États-Unis qu'en Europe ou en Asie (Chine, Sibérie,

Tableau 36.7 **Principales caractéristiques des *Ehrlichia* pathogènes pour l'homme.**

Genre	Espèce	Réservoirs	Vecteurs	Cellules cibles	Distribution géographique	Pathologie humaine
Ehrlichia	*E. chaffeensis*	Cervidés	*Amblyomma americanum*	Monocytes/ macrophages	États-Unis (Sud-Est, Centre-Est)	Ehrlichiose monocytaire humaine
	E. ewingii	Cervidés, chiens	*Amblyomma, Dermacentor*	Polynucléaires neutrophiles	États-Unis (Sud-Est, Centre-Est)	Ehrlichiose *ewingii* humaine
	E. canis	Chiens	*Rhipicephalus-sanguineus*	Monocytes/ macrophages	États-Unis (Sud-Est, Centre-Est)	Ehrlichiose monocytaire humaine
Anaplasma	*A. phagocytophilum*	Rongeurs, mammifères	*Ixodes persulcatus complexe*	Polynucléaires neutrophiles	États-Unis, Europe	Anaplasmose granulocytaire humaine
Neorickettsia	*N. sennetsu*	Helminthe	*Boophilus, Ripicephalus, etc.*	Monocytes/ macrophages	Inconnue	Ehrlichiose japonaise

Corée). Des infections provoquées par *A. phagocytophilum* ont été décrites en Europe du Nord (Scandinavie, Allemagne, Suisse, Slovénie, Grande-Bretagne), dans le pourtour méditerranéen (Espagne, Italie) et en France. En régions endémiques (États-Unis), l'incidence est supérieure à 50 cas pour 100 000 habitants. *A. phagocytophilum* peut être transmise par une espèce de tique transmettant aussi la maladie de Lyme ; les deux maladies peuvent d'ailleurs survenir conjointement. Par ailleurs, il a été montré récemment que la bactérie peut être transmise par transfusion sanguine, de façon nosocomiale ou périnatale.

L'ehrlichiose japonaise a été décrite en Asie, mais semble avoir actuellement disparu. Son réservoir est un helminthe parasitant les mulets gris, poissons consommés crus par ces populations qui s'infectent alors par voie alimentaire.

La fréquence des ehrlichioses est globalement mal connue mais probablement sous-estimée : seule une minorité de cas est diagnostiquée.

Les infections par ces bactéries sont assez souvent asymptomatiques ou paucisymptomatiques chez l'homme. Après une incubation de 5 à 21 jours en moyenne, l'infection symptomatique, quelle que soit la bactérie en cause, peut se traduire par un syndrome pseudogrippal, toujours fébrile, s'accompagnant parfois de symptômes gastro-intestinaux, d'un rash cutané (absent dans l'HGA) chez 65 % des enfants et 20 % des adultes, et de leucopénie, thrombopénie, d'élévation des enzymes hépatiques. L'infection est spontanément résolutive dans les 30 jours suivant le début des signes. Des formes sévères, rares, peuvent survenir soit très rapidement, soit à distance. L'ehrlichiose monocytaire humaine nécessite cependant une hospitalisation dans 42 % des cas et peut s'accompagner d'un syndrome de choc toxique fulminant, particulièrement chez les sujets immunodéprimés. Elle peut occasionner un syndrome de détresse respiratoire ou une hépatite. Une atteinte neurologique est trouvée chez 20 % des patients (méningite ou méningo-encéphalite). L'anaplasmose humaine se complique plutôt de neuropathies périphériques, mais peut aussi se présenter sous forme d'une paralysie faciale isolée, ces atteintes persistant des semaines ou des mois. Elle peut aussi se compliquer d'infections opportunistes, conséquences de la leucopénie. La mortalité est de 3 % pour l'HME et de 0,7 % pour l'HGA. L'ehrlichiose à *E. ewingii* ressemble à l'HME mais entraîne moins de complications. L'ehrlichiose japonaise se manifeste par des polyadénopathies et un syndrome mononucléosique. L'ehrlichiose à *E. canis* est mal décrite ; celle à *E. ewingii*, peu grave, survient essentiellement chez des immunodéprimés. *E. ruminantium* peut provoquer des formes graves et mortelles.

Caractères généraux d'orientation et de différenciation du genre

Ces bactéries de petite taille (0,4 à 1,5 µm) possèdent la structure des bactéries à Gram négatif, mais prennent mal cette coloration. Leur développement est obligatoirement intracellulaire et leurs cellules cibles sont différentes selon l'espèce considérée (Tableau 36.7). Elles répliquent dans des vacuoles cytoplasmiques de la cellule-hôte en formant des microcolonies ou morulae. Leur cycle de multiplication est complexe et évoque celui des *Chlamydiae*.

Diagnostic bactériologique

Diagnostic direct

Prélèvements

Il s'agit de prélèvements sanguins sur anticoagulant.

Examen direct

L'examen direct consiste à observer les morulae dans les cellules leucocytaires sur un frottis sanguin coloré par la technique de May-Grünwald-Giemsa. L'aspect est suffisamment

évocateur pour poser le diagnostic, mais cette technique est peu sensible. Elle doit être pratiquée dans la première semaine suivant l'apparition des signes cliniques, et avant tout traitement antibiotique, et est alors positive chez seulement environ 3 % des patients atteints d'HME et 25 à 75 % des patients avec HGA. La lecture doit être prolongée et attentive, car les morulae peuvent être présentes dans seulement 0,1 % des neutrophiles au cours de l'HGA.

Culture

C'est la méthode de référence pour confirmer un diagnostic d'ehrlichiose. L'isolement de cette bactérie nécessite un niveau de confinement P2 et n'est pratiqué que dans des laboratoires spécialisés. L'isolement est réalisé sur cultures cellulaires dépourvues d'antibiotique. La culture d'*A. phagocytophylum* nécessite un délai allant de quelques jours à plus de 2 semaines sur cellules HL-60, alors que *E. chaffeensis* pousse en 2 à 6 semaines sur cellules DH82. Les morulae sont recherchées après coloration au Giemsa. La sensibilité de la culture est très faible comparativement à la PCR pour *E. chaffeensis*, ce qui n'est pas le cas pour *A. phagocytophylum*.

Amplification génique (PCR)

C'est la technique de choix, du fait de sa grande spécificité (60 à 85 %), de sa sensibilité (60 à 85 % pour *E. chaffeensis*, 67 à 90 %, pour *A. phagocytophylum*), et de la rapidité du résultat. Elle permet de détecter aisément la présence des bactéries dans le sang des patients à la phase aiguë de la maladie et pendant plusieurs semaines après l'infection, en l'absence de traitement. Il est aussi possible de rechercher les bactéries dans le LCR, mais la technique est ici moins sensible. Des PCR multiplex permettant la détection simultanée de ces bactéries sont décrites dans la littérature.

Étude de la sensibilité aux antibiotiques

Cette étude est réalisée sur culture cellulaire en laboratoire de référence. Aucune résistance n'a été décrite pour les antibiotiques habituellement utilisés (tétracyclines).

Diagnostic indirect : sérodiagnostic

L'immunofluorescence indirecte est la technique sérologique de référence. Le diagnostic est préférentiellement posé sur l'augmentation significative du titre des anticorps entre deux sérums prélevés à 3 semaines d'intervalle. En effet, il n'est possible de détecter des IgM puis des IgG, dans le meilleur des cas, qu'au cours de la deuxième semaine post-infection et l'analyse d'un seul sérum en phase aiguë ne permet le diagnostic que chez 3 % des patients. Le pic d'IgG est obtenu vers la 8e semaine, et les anticorps persistent ensuite des années. Les nombreuses réactions croisées entre les différentes espèces, et avec les rickettsies, ne permettent pas de poser un diagnostic précis de l'espèce en cause. L'infection de cellules jouant un rôle dans l'immunité permettrait d'expliquer une absence de séroconversion chez certains patients. Par ailleurs, l'absence de réactif commercial ne permet pas de réaliser couramment ce sérodiagnostic.

Conclusion

Les ehrlichioses humaines, de découverte récente, sont de plus en plus reconnues comme des infections émergentes. La distribution étendue de leurs réservoirs et de leurs vecteurs et l'absence de diagnostic aisé répandu laissent penser que ces infections sont sous-estimées. Il est probable que, dans les années à venir, ces infections occupent une place plus importante.

Pour en savoir plus

Bakken JS, Dumler JS. Human granulocytic anaplasmosis. Infect Dis Clin North Am 2015; 29(2) : 341–55.

Dumler JS. Anaplasma and Ehrlichia infection. In : Hechemy KE, Oteo JA, Raoult DA, et al., editors. Rickettsioses : from genome to proteome, pathobiology, and rickettsiae as an international threat. Rickettsioses : from genome to proteome, pathobiology, and rickettsiae as an international threat, vol. 1063. New York : Annals of the New-York Academy of Sciences; 2005. p. 361–73.

Ismail N, Bloch KC, McBride JW. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. Clin Lab Med 2010; 30(1) : 261–92.

Thomas RJ, Dumler JS, Carlyon JA. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and Ehrlichia ewingii ehrlichiosis. Expert Rev Anti Infect Ther 2009; 7(6) : 709–22.

Adresse utile

Centre national de référence, unité des rickettsies
Faculté de Médecine
27, boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5
Tél. : 04 91 32 43 75 – Fax : 04 91 38 77 72

Chapitre 37

Bactéries anaérobies strictes

C. Isnard, F. Guérin, V. Cattoir

PLAN DU CHAPITRE

37.1 Généralités

C. Isnard, F. Guérin, V. Cattoir

Les bactéries anaérobies strictes sont des micro-organismes pour lesquels l'oxygène est toxique, même si leur tolérance à l'O_2 est variable selon les espèces. On peut notamment individualiser les bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène (*extremely oxygen sensitive* [EOS]) qui ne survivent que quelques secondes à une exposition à l'air ambiant, dont le rôle pathogène est peu connu. La plupart des espèces connues pour être impliquées dans les infections humaines sont capables de survivre un temps plus ou moins long en présence d'oxygène. Cependant, elles ne peuvent pas se développer sous air ambiant (sauf de rares exceptions). On peut classiquement distinguer les anaérobies stricts stricto sensu (non viables après une exposition de 60 minutes à l'air, et incapables de se développer avec une teneur en O_2 supérieure à 0,5 %) et les anaérobies modérés (viables après une exposition de 80 minutes à l'air, et capables de se développer sous une teneur en O_2 inférieure à 3 %).

La taxonomie des anaérobies stricts a beaucoup évolué ces dernières années avec la création de nombreux genres et espèces. Et même si les connaissances sur ce groupe de bactéries très hétérogène se sont beaucoup améliorées, cela a complexifié le rendu des résultats au clinicien.

Les bactéries anaérobies représentent une composante majeure des différents microbiotes humains, notamment au niveau de la peau, de la cavité orale, du tractus digestif et de la sphère vaginale (Tableau 37.1).

Comparativement au nombre extrêmement élevé d'espèces anaérobies, peu d'entre elles sont impliquées dans les infections humaines. Même si quelques-unes sont dues à des bactéries exogènes (par exemple *Clostridium*), la grande majorité des infections sont d'origine endogène : infections au niveau de la tête et du cou, infections thoraciques, infections intra-abdominales et digestives et infections gynéco-obstétricales. Il est important de noter que la grande majorité (environ 85 %) des infections à anaérobies sont mixtes, associant généralement 5 à 6 aérobies et anaérobies.

Pour l'isolement de bactéries anaérobies, différents points sont majeurs :

- un temps de manipulation à l'air libre le plus court possible. À noter qu'une exposition du prélèvement de 20 à 40 minutes à l'air peut entraîner une réduction de 30 à 50 % du nombre de colonies de bactéries anaérobies ;
- une qualité de prélèvement optimale (hémoculture anaérobie, aspiration, curetage, biopsie tissulaire) en évitant au maximum le contact avec la flore commensale ;
- un mode de transport approprié et rapide, avec par exemple : culturette anaérobie, Portagerm® (bioMérieux), TGV anaérobie® (Becton Dickinson) ;
- l'utilisation de milieux de culture bien réduits, avec régénération avant utilisation (passage de 15 minutes dans un bain-marie bouillonnant) ;
- l'obtention d'une bonne aérobiose (teneur en O_2 < 1 %) le plus rapidement possible, avec par ordre de préférence : enceintes anaérobies ; jarres avec système

Bactériologie médicale

Tableau 37.1 **Quantité et proportion des bactéries anaérobies strictes au sein des différents microbiotes humains.**

Sites anatomiques	Échantillons	Nombre de bactéries (par g ou ml)	Rapport anaérobies:aérobies
Voies aériennes supérieures	Lavage nasal	10^3–10^4	3–5:1
	Salive	10^8–10^9	1:1
	Surface dentaire	10^{10}–10^{11}	1:1
	Plis gingivaux	10^{11}–10^{12}	10^3:1
Tractus gastro-intestinal	Estomac	0–10^5	1:1
	Jéjunum/iléon	10^4–10^7	1:1
	Côlon	10^{11}–10^{12}	10^3:1
Sphère vaginale		10^7–10^9	1–10:1

d'évacuation-remplacement du gaz type Anaxomat® (Mart) ou Bacto-jarre® (Sobioda) ; jarres ou sachets plastiques avec systèmes générateurs d'anaérobiose type BioBag® (Becton Dickison), Anaerocult® (Merck) ou GENBag® Anaer (bioMérieux).

L'examen d'un échantillon contenant des anaérobies peut présenter les caractéristiques suivantes : forte odeur fétide, quantité importante de pus, présence de gaz, un examen direct après coloration de Gram montrant peu de leucocytes et de nombreux morphotypes différents (c'est la « dissociation cytobactériologique de Prévot »).

Comme mentionné plus haut, l'ensemencement des échantillons doit se faire sur des milieux fraîchement régénérés ou conservés en anaérobiose. Il est souhaitable d'ensemencer un milieu liquide (par exemple Schaedler + vitamine K_3, Brucella, Rosenow cystéiné) et un milieu gélosé non sélectif (par exemple Columbia ou Brucella + 5 % de sang de mouton). En cas de flore polymorphe, des milieux sélectifs doivent être ajoutés, comme : Schaedler au sang de mouton + néomycine-vancomycine ou Brucella au sang laqué + kanamycine-vancomycine pour les bacilles à Gram négatif, ou Columbia au sang de mouton + acide nalidixique-colistine. Des géloses spécifiques sont aussi disponibles (voir ci-dessous).

L'identification des germes anaérobies a longtemps été fastidieuse et reposait sur des tests enzymatiques et biochimiques, notamment à l'aide de galeries de type API 20A® (bioMérieux), Rapid ID 32 A® (bioMérieux) et Rapid ANA II® (Remel). Dorénavant, de nombreux laboratoires possèdent des systèmes de spectrométrie de masse MALDI-TOF qui permettent une identification rapide et fiable dans la majorité des cas (dans environ 70 à 90 % et 90 à 95 % des cas au niveau de l'espèce et du genre, respectivement). En cas d'identification douteuse, il est nécessaire de recourir au séquençage du gène codant l'ARNr 16S qui reste la méthode de référence.

L'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des anaérobies n'est pas réalisée de façon systématique car le traitement empirique est instauré bien avant d'avoir les résultats et qu'il couvre généralement la grande majorité des espèces anaérobies. Cependant, depuis plusieurs années, il y a une augmentation significative de la résistance avec apparition de nouveaux mécanismes, notamment chez les espèces du groupe *Bacteroides fragilis*. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques est recommandée dans les situations suivantes : isolement en culture pure ou dans une hémoculture, dans les infections sévères, en cas d'échec de l'antibiothérapie empirique, pour la surveillance épidémiologique de la résistance. À noter que les anaérobies stricts sont naturellement résistants aux aminosides, à l'aztréonam (sauf *Fusobacterium*), au triméthoprime et aux quinolones.

La méthode de dilution en gélose est la méthode de référence recommandée par le Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) américain. Le milieu *Brucella*, additionné avec 5 % de sang de mouton laqué et enrichi en hémine (5 mg/l) et en vitamine K_1 (1 mg/l), doit être utilisé. La suspension bactérienne (0,5 McFarland) est inoculée à l'aide d'un appareil de Steers pour avoir un inoculum final d'environ 10^5 UFC par spot. Les géloses sont ensemencées à 35 à 37 °C pendant 42 à 48 heures. Même si cette méthode est considérée comme la référence, elle est longue, laborieuse et coûteuse, et elle n'est généralement pas réalisée en routine par les laboratoires de microbiologique clinique. La méthode de microdilution en milieu liquide est plus simple à réaliser, mais elle n'est recommandée par le CLSI que pour les espèces du groupe *B. fragilis*. En pratique, c'est la méthode de diffusion sur milieu gélosé qui est très utilisée, même si elle n'est pas toujours la plus adaptée. Rapide, simple et peu chère, elle paraît performante pour les anaérobies à croissance rapide (par exemple *Bacteroides*, *Clostridium*). Selon le CA-SFM, deux milieux sont recommandés (gélose Wilkins Chalgren + 5 % de sang ou gélose Brucella + 5 % de sang + vitamine K_1 [1 mg/l]) avec une suspension bactérienne d'inoculum McFarland 1 (voir communiqué du CA-SFM 2013). Différents tests commerciaux existent également et peuvent être très utiles : méthodes de gradient en diffusion (bandelettes E-test® [bioMérieux] et MICE® [Thermo Fisher Scientific]), galeries en milieu liquide (ATB ANA® [bioMérieux], panels Sensititre® [Thermo Fisher Scientific]). Enfin, le test à la céphalosporine chromogénique (nitrocéfine) est très utile pour la recherche de β-lactamase chez les bacilles à Gram négatif anaérobies (par exemple *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*) et pour quelques souches de *Clostridium* résistantes aux pénicillines.

37.2 Bacilles à Gram positif anaérobies non sporulés

C. Isnard, F. Guérin, V. Cattoir

Généralités

Les bactéries à Gram positif anaérobies non sporulées correspondent à de nombreux genres bactériens qui appartiennent à deux phyla : *Actinobacteria* et *Firmicutes* (Tableau 37.2).

Les espèces des genres *Arcanobacterium* et *Lactobacillus* ne seront pas traitées dans ce chapitre (voir chapitres 32.1 et 32.3, respectivement).

Habitat et pouvoir pathogène

La majorité des bacilles à Gram positif anaérobies non sporulés font partie du microbiote oral, intestinal, urogénital et cutané. Pathogènes opportunistes, ils sont généralement retrouvés dans des infections polymicrobiennes diverses (infections du système nerveux central [SNC], infections buccodentaires, infections respiratoires, infections intra-abdominales, infections génito-urinaires, infections de la peau et des tissus mous, infections ostéoarticulaires, bactériémies et endocardites). À noter que la porte d'entrée des bactériémies est généralement digestive.

Actinomyces et genres apparentés

Les *Actinomyces* et apparentés sont associés à un très grand nombre d'infections. À ce jour, il existe plus de 40 espèces d'*Actinomyces* dont les plus fréquemment retrouvées dans les prélèvements humains sont : *A. europaeus*,

Tableau 37.2 **Caractéristiques générales des principaux bacilles à Gram positif anaérobies non sporulés.**

Genre	Aspect microscopique	Aérotolérance[a]	Coloration de Gram[b]
Actinobacteria			
Actinobaculum	Bacilles droits ou légèrement incurvés avec branchements; isolés ou en amas	+/–	(+)
Actinomyces	Aspect variable (bacilles souvent branchés); isolés ou par paires	+/–	+
Alloscardovia	Bacilles courts irréguliers	+	+
Atopobium	Bacilles courts; isolés, par paires ou en courtes chaînettes	+/–	+
Bifidobacterium	Aspect variable	–/+	+
Cryptobacterium	Bacilles courts	–	(+)
Eggerthella	Coccobacilles ou bacilles courts; par paires ou en courtes chaînettes	–	+
Mobiluncus	Bacilles incurvés avec extrémités effilées (en « coup d'ongle »); isolés ou par paires; mobiles	–	V
Paraeggerthella	Coccobacilles; en chaînettes	–	+
Parascardovia	Petits bacilles fins	–	+
Propionibacterium	Aspect variable	–/+	+
Scardovia	Coccobacilles	–	+
Slackia	Cocci, coccobacilles ou bacilles courts; isolées ou en paquets	–	(+)
Varibaculum	Bacilles courts droits ou incurvés; diphtérimorphes	–/+	+
Firmicutes			
Bulleidia	Bacilles courts; isolés ou par paires	–	+
Eubacterium	Aspect variable	–	V
Filifactor	Bacilles courts réguliers	–	–
Lactobacillus	Bacilles fins courts ou longs; en chaînettes	–/+	+
Mogibacterium	Baciles courts; isolés ou en paquets	–	(+)
Pseudoramibacter	Aspect plésiomorphe; par paires	–	+

[a] +, aérotolérant; +/– ou –/+, aérotolérance variable selon les espèces; –, strictement anaérobie.
[b] +, positive; –, négative; v, variable; (+), décoloration si culture âgée.

A. georgiae, *A. israelii*, *A. meyeri*, *A. naeslundii*, *A. neuii*, *A. odontolyticus*, *A. oris*, *A. radingae*, *A. turicensis*, *A. urogenitalis* et *A. viscosus*.

L'espèce *A. israelii* est classiquement responsable de l'actinomycose, pathologie infectieuse chronique et granulomateuse définie par l'apparition d'une masse lésionnelle avec formation de « grains ». Cette infection touche les patients de tous âges, immunodéprimés ou non, et atteint généralement les régions cervicofaciale, pulmonaire et abdomino-pelvienne (infections sur stérilet). Le tableau clinique le plus caractéristique est l'actinomycose cervicofaciale qui correspond à une suppuration d'évolution lente, généralement sous-maxillaire et secondaire à une infection dentaire, et qui s'étend progressivement aux tissus avoisinants avec nécrose. À noter que d'autres espèces peuvent être responsables d'actinomycose, comme *A. gerencseriae*, *A. graevenitzii* et *A. meyeri*. Les différentes espèces d'*Actinomyces* sont retrouvées dans différents types d'abcès, notamment dentaires et cérébraux.

Parmi les espèces du genre *Actinobaculum*, *Actinobaculum schaalii* (reclassé très récemment comme *Actinotignum schaalii*) est un uropathogène émergent, responsable de nombreuses infections urinaires (mais aussi invasives), notamment chez le sujet âgé et les patients avec des facteurs de risque urologiques. Enfin, l'espèce *Varibaculum cambriense* a été associée à des infections polymicrobiennes (notamment abcès cérébraux et infections sur stérilet).

Propionibacterium

Les bactéries du genre *Propionibacterium* sont des pathogènes opportunistes pouvant être responsables de différents types d'infections invasives, comme des endocardites, des infections du SNC et des infections ostéoarticulaires ainsi que des infections après morsure. Quatre espèces sont généralement retrouvées en pathologie humaine : *P. acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum* et *P. propionicum*. Bactérie faisant partie du microbiote cutané humain, l'espèce *P. acnes* est souvent considérée comme un contaminant. Cependant, en plus d'être responsable de l'acné vulgaire, cette espèce est devenue un pathogène important dans les infections sur matériel (endocardites et infections ostéoarticulaires) et postchirurgicales (endophtalmies, abcès de cerveau). À noter que *P. propionicum* est une des causes d'actinomycose.

Eubacterium et genres apparentés

De nombreux changements taxonomiques ont eu lieu au sein du genre *Eubacterium* qui était très hétérogène, avec la création de nouveaux genres bactériens. Les bactéries communément regroupées sous le terme « *Eubacterium-like* » sont généralement isolées d'infections buccodentaires, dont les espèces les plus fréquentes sont : *Collinsella aerofaciens*, *Eubacterium nodatum*, *E. saphenum*, *Mogibacterium timidum*, *M. vescum*, *Bulleidia extructa*, *Cryptobacterium curtum*, *Slackia exigua*, *Filifactor alocis* et *Pseudoramibacter alactolyticus*. Dans les hémocultures, les espèces *Eggerthella lenta* (anciennement *Eubacterium lentum*) et *Paraeggethella hongkongensis* sont les bacilles à Gram positif anaérobies non sporulés les plus fréquemment impliqués. Enfin, *E. lenta* est bien connu comme responsable d'infections intra-abdominales.

Atopobium et *Olsenella*

Quelques espèces du genre *Atopobium* ont été isolées de différents types d'infections (notamment d'abcès abdomino-pelviens), comme *A. vaginae*, *A. minutum* et *A. parvulum*. À noter qu'il existe une forte association entre *A. vaginae* et vaginose bactérienne. En effet, la présence de cette espèce avec d'autres bactéries anaérobies (*Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Mobiluncus* spp.) associée à une réduction des *Lactobacillus* spp. semble prédire de façon fiable cette pathologie (voir chapitre 23).

Enfin, deux espèces du genre *Olsenella* sont quelquefois responsables d'infections humaines : *O. profusa* et *O. uli*.

Bifidobacterium et genres apparentés

Les *Bifidobacterium* spp. font partie du microbiote intestinal humain (notamment *B. longum*) et semblent être essentielles à son homéostasie. Même si ces espèces sont considérées comme non pathogènes, certaines d'entre elles ont été isolées dans des infections polymicrobiennes, principalement des caries dentaires dues à *B. dentium*, *Parascardovia denticolens* et *Scardovia inopinata*. De rares infections non dentaires ont aussi été décrites chez les patients immunodéprimés. Enfin, l'espèce *Alloscardovia omnicolens* pourrait être un pathogène émergent, notamment responsable d'infections urinaires chez le sujet âgé ou certains patients prédisposés au niveau urologique.

Mobiluncus

Les deux espèces de *Mobiluncus* (*M. curtisii* et *M. mulieris*) sont des hôtes normaux du microbiote vaginal et sont responsables avec d'autres bactéries anaérobies (*G. vaginalis*, *P. bivia*, *A. vaginae*) de vaginose bactérienne.

Diagnostic bactériologique

L'examen direct est l'examen clé pour le diagnostic d'actinomycose. En effet, après broyage des grains (appelés « granules de soufre »), l'examen microscopique après coloration de Gram va mettre en évidence des amas de filaments branchés à Gram positif. De la même façon, l'examen direct est beaucoup plus utile que la culture pour le diagnostic de vaginose bactérienne (score de Nugent).

Comme pour la majorité des autres bactéries anaérobies, la culture se fait sur milieu au sang enrichi en hémine et vitamine K_1. Des milieux sélectifs avec antibiotiques, type ANC (acide nalidixique-colistine) ou CAP (colistine-aztréonam), peuvent être utilisés pour améliorer l'isolement des bactéries à Gram positif. L'incubation doit se faire à 35 °C en anaérobiose pendant au moins 48 heures. À noter que l'aérotolérance peut être recherchée par incubation d'une gélose au sang ou chocolat en aérobiose enrichie avec 5 % de CO_2.

Quelques caractères (aérotolérance, aspect colonial, pigmentation, catalase) peuvent être utilisés pour l'identification présomptive de certaines espèces. Par exemple, la plupart des espèces des genres *Actinomyces* (sauf *A. meyeri*) et *Propionibacterium* (sauf *P. propionicum*) sont aérotolérantes, alors que les espèces des genres *Atopobium* et *Olsenella* sont anaérobies strictes. La plupart des

Actinomyces présentent une réaction de catalase négative, sauf *A. neuii* et *A. viscosus*. Parmi les *Eubacterium-like*, les espèces des genres *Eggerthella* et *Paraeggerthella* présentent une réaction de catalase positive. Les colonies d'*A. odontolyticus* sont pigmentées en rose/rouge. Au niveau microscopique, certains éléments peuvent être notés comme : des bacilles très courts (par exemple *C. curtum*, *E. lenta*), un aspect pléomorphe (par exemple *Bifidobacterium* spp.), des bacilles branchés (par exemple *Actinomyces* spp.), des bacilles à Gram variable ou négatif incurvés et mobiles (par exemple *Mobiluncus* spp.).

L'identification précise était classiquement entreprise avec des galeries biochimiques dont les performances n'étaient pas optimales. Alors que le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S reste la méthode de référence, l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF semble tout à fait fiable.

Sensibilité aux antibiotiques et traitement

Les bacilles à Gram positif anaérobies non sporulés sont parmi les plus sensibles aux antibiotiques, notamment aux pénicillines et autres β-lactamines. La pénicilline G et l'amoxicilline constituent le traitement de première intention. Dans l'actinomycose, l'antibiothérapie doit être maintenue pendant 3 à 6 mois.

Il est important de noter que même si le métronidazole est la molécule de choix pour le traitement des infections à anaérobies, les espèces des genres *Actinobaculum*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* y sont naturellement résistantes. Hormis certaines espèces de *Lactobacillus* (voir chapitre 32.3), les glycopeptides sont constamment actifs. Enfin, les macrolides, la clindamycine, les tétracyclines, la tigécycline, le linézolide et la daptomycine sont généralement aussi très actifs. À noter cependant que 15 à 20 % des souches de *P. acnes* sont résistantes à la clindamycine.

37.3 Bacilles à Gram positif anaérobies sporulés

C. Isnard, F. Guérin, V. Cattoir

Généralités

Ce groupe bactérien correspond principalement au genre *Clostridium*, qui compte plus de 200 espèces. Ce genre très hétérogène comprend des bacilles à Gram positif mobiles (sauf *C. perfringens*, *C. ramosum* et *C. innocuum*) formant des spores souvent déformantes terminales ou subterminales. Grâce à ces spores qui permettent une très grande résistance à la chaleur, à la dessiccation et aux traitements antiseptiques, les *Clostridium* sont très répandus dans l'environnement, notamment au niveau du sol. Sauf quelques espèces qui sont aérotolérantes (voir ci-dessous), les *Clostridium* sont des bactéries à métabolisme strictement anaérobie (Encadré 37.1) et se différencient assez facilement des *Bacillus* (chapitre 32).

Encadré 37.1 Caractères différentiels entre les espèces de *Clostridium* aérotolérantes et les espèces du genre *Bacillus*

- Les *Clostridum* forment généralement des spores en anaérobiose.
- Les *Clostridium* cultivent mieux en anaérobiose qu'en aérobiose.
- Les *Clostridium* ne produisent ni catalase ni oxydase.

Habitat et pouvoir pathogène

De nombreuses espèces de *Clostridium* font partie du microbiote humain (intestinal, vaginal et oral), tandis que seules quelques-unes d'entre elles sont pathogènes pour l'homme. Leur pouvoir pathogène est principalement lié à la production de différentes toxines (par exemple neurotoxines, entérotoxines, cytotoxines, toxines nécrosantes) et enzymes (par exemple collagénases, lipases, lécithinases, hémolysines, protéases, hyaluronidases, DNases, ADP-ribosyltransférases, neuraminidases).

Les *Clostridium* responsables de syndromes toxiniques bien connus sont *C. botulinum*, *C. tetani* et *C. perfringens*, tandis que *C. difficile* est devenu un pathogène majeur dans les hôpitaux. À côté de ces tableaux cliniques classiques, de nombreuses infections peuvent être dues à des espèces de la flore endogène. Ce sont généralement des infections mixtes en association avec des bactéries aérobies et/ou anaérobies (par exemple bactériémies, abcès de cerveau et pulmonaires, infections ORL, infections intra-abdominales et gynécologiques, infections de la peau et des tissus mous, infections ostéoarticulaires).

Botulisme et *C. botulinum*

Le botulisme est une maladie résultant de l'intoxication par la neurotoxine botulinique élaborée par l'espèce *C. botulinum* et quelques souches de *C. butyricum*, *C. baratii* et *C. argentinense*. Cette toxine est le poison connu le plus puissant dont il existe 7 variants antigéniques (toxinotypes de A à G). À noter que ce sont les toxinotypes A, B et E qui sont responsables de la majorité des cas de botulisme chez l'homme. Les souches de *C. butyricum* et *C. baratii* produisent respectivement les toxinotypes E et F et sont impliquées dans le botulisme infantile. Après passage par le sang ou la lymphe, la toxine botulinique inhibe après internalisation la libération d'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire des motoneurones, ce qui résulte en une paralysie flasque.

Il existe trois grands types de botulisme selon le mode de contamination : le botulisme alimentaire ou intoxination botulique après ingestion de toxine botulinique préformée dans un aliment contaminé (par exemple conserves « maison » mal stérilisées), le botulisme d'inoculation avec pénétration de la bactérie au niveau d'une plaie et élaboration

de la toxine in vivo (par exemple toxicomanes IV) et le botulisme avec production de la toxine au niveau du tube digestif, chez l'enfant (botulisme infantile) ou l'adulte. Le botulisme est une maladie rare et seulement une vingtaine de cas sont déclarés en France par an.

À noter que la toxine botulinique est utilisée en médecine dans le traitement de certaines affections neurologiques et en esthétique (Botox®).

Tétanos et *C. tetani*

Le tétanos est une maladie due à la production d'une neurotoxine (appelée toxine tétanique ou tétanospasmine) par *C. tetani*. Cette infection est liée à une plaie tellurique qui ne semble pas infectée (par exemple une piqûre de rosier), avec la production in situ de la toxine. Après migration par voie rétro-axonale, la toxine inhibe la libération de neuromédiateurs (glycine, GABA) par les interneurones inhibiteurs, entraînant une paralysie spastique localisée ou généralisée. Le diagnostic du tétanos est essentiellement clinique. Grâce à la vaccination, les cas de tétanos sont devenus exceptionnels en France (<20 cas/an). Cependant, plus de 500 000 cas par an sont estimés dans le monde, pratiquement tous dans les pays en voie de développement qui n'ont pas de couverture vaccinale contre le tétanos.

Gangrène gazeuse et *C. perfringens*

La gangrène gazeuse ou myonécrose clostridienne apparaît dans la grande majorité des cas après une blessure traumatique (par exemple fracture ouverte, plaie par arme, toxicomanie IV) contaminée par des spores de *C. perfringens*. D'autres espèces peuvent aussi être impliquées comme *C. histolyticum*, *C. septicum*, *C. novyi* et *C. sordellii*. Cette entité clinique, caractérisée par une nécrose extensive rapide et très douloureuse avec présence de gaz dans les tissus, est liée à la production de nombreuses protéases, phospholipases et cytotoxines, notamment la toxine α (à activité phospholipase C et sphingomyélinase) synthétisée par *C. perfringens*. D'autres infections sévères dues à *C. perfringens* sont aussi possibles : cholécystite gangréneuse, pneumonie nécrosante ou entérocolite nécrosante (notamment chez le prématuré, à côté d'autres clostridiales comme *C. neonatale*). À noter que *C. septicum* peut être responsable de gangrène gazeuse spontanée non traumatique et que *C. sordellii* est impliqué dans des cas de gangrène gazeuse au niveau utérin. Des cas d'endophtalmies sont aussi dus à *C. sordellii* et à *C. perfringens*.

Infections à *C. difficile*

C. difficile est impliqué dans 10 à 25 % des diarrhées postantibiotiques, dans 10 % des diarrhées nosocomiales et dans plus de 95 % des cas de colite pseudomembraneuse (CPM). Seules les souches toxinogènes sont pathogènes par production de l'entérotoxine A (TcdA) et/ou de la cytotoxine B (TcdB). À noter que certaines souches peuvent aussi synthétiser une toxine dite binaire dont le rôle pathogène n'est pas clairement défini. Enfin, depuis 2006, un clone épidémique (clone 027 ou NAP1) a émergé au niveau mondial.

La symptomatologie digestive est très variable, allant de la simple diarrhée au mégacôlon toxique. L'infection à *C. difficile* (ICD) est définie par un tableau clinique compatible avec la preuve microbiologique de la présence d'une souche productrice de toxines dans les selles sans autre cause évidente de diarrhée, ou par la mise en évidence d'une CPM (endoscopie, colectomie, autopsie). Le principal problème de l'ICD est lié au risque de récidive (d'environ 20 à 25 % après un premier épisode) qui augmente au fil des récidives. Exceptionnellement, *C. difficile* est responsable d'infections extradigestives (par exemple bactériémies, arthrites, abcès).

Autres infections à *Clostridium* spp.

C. perfringens (souches de type A productrices d'entérotoxine) est une des causes les plus fréquentes de toxi-infections alimentaires dues à l'ingestion de viande insuffisamment ou non cuite. Il est également l'agent étiologique de diarrhée persistante chez le sujet âgé.

Différentes espèces (*C. septicum*, *C. tertium* et *C. perfringens*) peuvent être responsables de bactériémies, notamment chez le patient neutropénique (dans un contexte d'entérocolite) ou diabétique.

Les autres espèces plus rarement retrouvées en pathologie humaine sont *C. bifermentans*, *C. cadarevis*, *C. glycolicum*, *C. innocuum*, *C. ramosum*, *C. sporogenes*, *C. symbiosum* et celles du groupe *C. clostridioforme* (*C. clostridioforme*, *C. hathewayi* et *C. bolteae*).

Diagnostic bactériologique

Le diagnostic du botulisme alimentaire peut être réalisé par la recherche de la toxine dans les aliments, le sérum ou le contenu gastrique du malade ou par la mise en évidence de la bactérie dans les aliments suspects. La recherche de la toxine botulinique (appelée toxinotypie) est réalisée par la technique de référence de séroneutralisation chez la souris. Technique très sensible et spécifique, elle est cependant longue et nécessite une infrastructure lourde. À l'heure actuelle, elle tend à être remplacée par les techniques de PCR. En France, le diagnostic du botulisme (sur prélèvements humains ou aliments) est réalisée par les laboratoires vétérinaires et la recherche de la toxine botulinique est effectuée au Centre national de référence (CNR) des bactéries anaérobies et botulisme à l'Institut Pasteur de Paris.

Le diagnostic bactériologique de l'infection à *Clostridium difficile* (ICD) repose sur la mise en évidence dans les selles diarrhéiques soit des toxines libres, soit d'une souche toxinogène à l'aide de différentes méthodes (Tableau 37.3 et Encadré 37.2). À noter que l'isolement de *C. difficile* peut se faire sur milieu sélectif (par exemple CCFA pour cyclosérine-céfoxitine-fructose-agar) ou sur milieu chromogène (Fig. 37.1). Après 48 heures d'incubation à 35 °C en anaérobiose, les colonies sur milieu CCFA sont facilement reconnaissables (d'un diamètre de 3 à 5 mm, grises, circulaires à bords irréguliers et non hémolytiques) avec un aspect de « verre dépoli » à la loupe binoculaire et une odeur caractéristique de « crottin de cheval ». L'identification définitive peut être réalisée par galeries biochimiques, agglutination spécifique ou spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Tableau 37.3 **Méthodes diagnostiques des infections à *Clostridium difficile* (ICD).**

Cible	Méthode	Avantages	Inconvénients
Toxines libres	Test de cytotoxicité des selles par mise en évidence de l'effet cytopathogène (ECP) (méthode de référence)	Sensibilité ++ Spécificité +++	Délai long (≥ 2 j) Neutralisation de l'ECP Absence de standardisation Infrastructure lourde
	Tests immuno-enzymatiques (ELISA) ou immunochromatographiques	Spécificité +++ Rapidité (0,5–3 h)	Faible sensibilité
Souche de *C. difficile*	Glutamate déshydrogénase (GDH)	Excellente VPN (>90 %) Rapidité (<0,5 h)	Faible spécificité[a]
Souche toxinogène de *C. difficile*	Culture toxigénique (méthode de référence)	Sensibilité +++ Antibiogramme	Délai long (≥ 2 j) Faible spécificité[b]
	Biologie moléculaire (PCR)	Sensibilité +++ Rapidité (1–3 h)	Coût +++ Faible spécificité[b]

[a] Détection des souches toxinogènes et non toxinogènes.
[b] Détection des porteurs asymptomatiques de souches toxinogènes.

Encadré 37.2 **Points pratiques à retenir pour le diagnostic des infections à *C. difficile* (ICD)**

- Diagnostic d'ICD à faire uniquement sur les selles diarrhéiques (selles de type 5 à 7 sur l'échelle de Bristol).
- Pas de recherche (hors cas particuliers) de *C. difficile* chez les enfants de moins de 2 ans (portage asymptomatique de 30 à 80 %).
- « Règle des 3 jours » : recherche systématique de *C. difficile* chez les patients hospitalisés depuis plus de 3 jours.
- Recherche systématique de *C. difficile* chez les patients avec MICI (maladie inflammatoire chronique de l'intestin) hospitalisés pour une poussé de la maladie.
- « Règle des 7 jours » : pas de répétition des tests dans les 7 jours suivant un premier test négatif (gain environ 2 %).
- Pas de contrôle après traitement (efficacité uniquement sur critères cliniques).

Comme aucune méthode n'est à la fois sensible, spécifique, rapide et peu chère, différents algorithmes pour le diagnostic d'ICD ont été proposés (Fig. 37.2).

Pour les espèces autres que *C. botulinum*, *C. tetani* et *C. difficile*, l'isolement se fait à partir d'hémocultures ou de prélèvements de suppurations principalement d'origine digestive. De croissance rapide (généralement en 24 heures), les *Clostridium* cultivent sur milieux enrichis au sang type Brucella et Columbia. L'aspect des colonies et le caractère hémolytique doivent être notés. Certains milieux spécifiques peuvent être utilisés, comme le milieu au jaune d'œuf permettant de mettre en évidence l'activité lécithinase ou lipase. D'autres milieux sélectifs peuvent être employés pour la détection de *C. perfringens*, comme le milieu TSN (tryptone-sulfite-néomycine) et le milieu PEA au phényléthylalcool enrichi avec 5 % de sang.

Certaines espèces ne sporulent que très difficilement (par exemple *C. ramosum*) et un test de sporulation après chauffage à 80 °C pendant 10 minutes peut s'avérer utile. Quelques espèces prennent mal la coloration de Gram et peuvent apparaître à Gram négatif, comme *C. clostridioforme*, *C. hathewayi*, *C. innocuum* et *C. ramosum*. Enfin, quelques espèces de *Clostridium* sont aérotolérantes, comme *C. tertium*, *C. histolyticum* et *C. carnis*.

L'identification précise des *Clostridium* au niveau de l'espèce repose traditionnellement sur les tests biochimiques. Cependant, à l'heure actuelle, la spectrométrie de masse MALDI-TOF est devenue l'outil principal permettant une identification fiable des espèces du genre *Clostridium* dans la grande majorité des cas.

Sensibilité aux antibiotiques et traitement

La plupart des *Clostridium* sont sensibles aux pénicillines, aux carbapénèmes et au métronidazole, antibiotiques qui constituent le traitement de choix. À noter que toutes les souches de *C. perfringens* sont sensibles aux pénicillines et au métronidazole. Environ 30 % des espèces de *Clostridium* spp. sont résistantes à la céfoxitine ou à la clindamycine.

Une résistance aux pénicillines peut être observée chez quelques souches de *C. butyricum*, *C. clostridioforme* et *C. ramosum*. La production de la β-lactamase peut être détectée par la méthode chromogénique (test à la nitrocéfine). À noter que seule la β-lactamase de *C. butyricum* est inhibée, aux concentrations thérapeutiques, par les inhibiteurs de β-lactamases.

C. innocuum présente une résistance de bas niveau à la vancomycine (CMI = 8–32 mg/l), mais reste sensible à la téicoplanine comme à la tigécycline et au métronidazole. *C. ramosum* est résistant à la vancomycine et à la daptomycine ainsi qu'au linézolide à bas niveau.

C. difficile présente une résistance naturelle à la céfoxitine et a acquis une résistance à la clindamycine dans plus de 50 % des cas. Le traitement des ICD repose sur trois molécules (métronidazole, vancomycine et fidaxomicine) et aucune résistance de haut niveau n'a été décrite à ce jour (seulement quelques rares cas de sensibilité diminuée au métronidazole non corrélés à des échecs cliniques). À noter que la souche épidémique 027 présente deux marqueurs de résistance spécifiques : une résistante de haut niveau à l'érythromycine et à la moxifloxacine.



Fig. 37.1 Aspect macroscopique des colonies de *C. difficile* sur milieu chromogénique CDIF de chez bioMérieux (A) ou sur milieu CCFA (B) et de colonies β-hémolytiques sur gélose au sang frais (C). *(Photographie : M. Auzou.)*

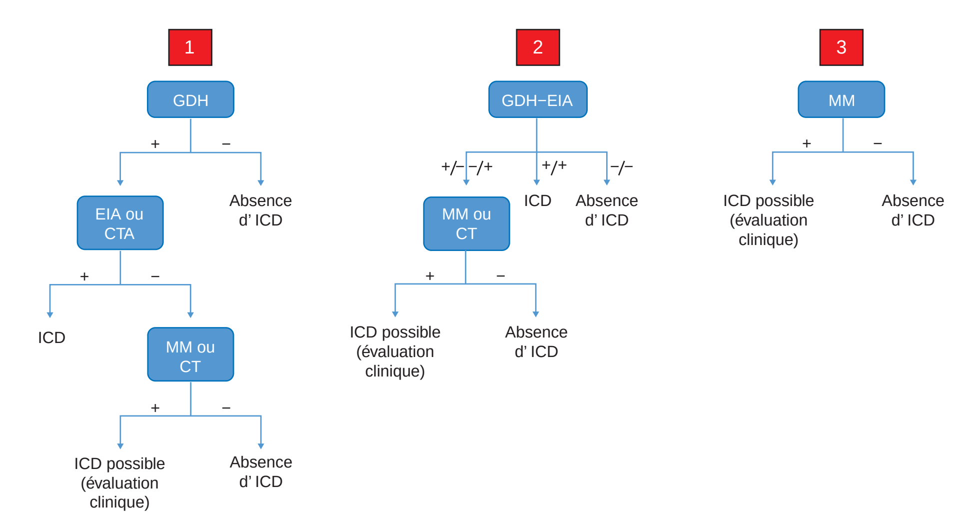


Fig. 37.2 Algorithmes pour le diagnostic des infections à *C. difficile*. CT : culture toxigénique ; CTA : test de cytotoxicité des selles ; EIA : test immuno-enzymatique ou immunochromatographique ; GDH : glutamate déshydrogénase ; ICD : infections à *C. difficile* ; MM : méthode moléculaire.

37.4 Bacilles à Gram négatif anaérobies

C. Isnard, F. Guérin, V. Cattoir

Généralités

La grande majorité des bacilles à Gram négatif anaérobies d'intérêt médical appartiennent aux phyla des *Bacteroidetes* (familles des *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* et *Rikenellaceae*) et à celui des Fusobacteria (*Fusobacteriaceae* et *Leptotrichiaceae*). Quelques autres espèces font partie des phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria* et *Synergistetes*.

Habitat et pouvoir pathogène

Ces bactéries appartiennent pour la plupart au microbiote humain au niveau de la cavité orale (*Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*), du tractus intestinal (*Bacteroides*) et du vagin (*Prevotella*).

Elles sont retrouvées dans de nombreux types d'infections le plus souvent polymicrobiennes (infections du SNC,

infections buccodentaires, infections ORL et respiratoires, infections intra-abdominales, infections génito-urinaires, infections de la peau et des tissus mous, infections ostéoarticulaires, bactériémies et endocardites). À noter que les portes d'entrée des bactériémies sont le plus souvent le tube digestif et l'oropharynx.

Bacteroides et genres apparentés

Actuellement, le genre *Bacteroides* est limité aux espèces du groupe *B. fragilis* qui comprend à ce jour plus de 30 membres. Ce sont les anaérobies les plus fréquents, les plus virulents et les plus résistants aux antibiotiques. Les espèces les plus fréquentes sont *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* et *B. ovatus*, le plus souvent isolées de bactériémies et d'infections intra-abdominales. D'autres espèces peuvent être retrouvées comme *B. caccae*, *B. dorei*, *B. eggerthii*, *B. finegoldii*, *B. intestinalis*, *B. massiliensis*, *B. nordii*, *B. salyersae*, *B. stercoris*, *B. uniformis* et *B. vulgatus*. À noter que 10 à 20 % des souches de *B. fragilis* produisent une entérotoxine et sont responsables de diarrhées. Enfin, les *Bacteroides* peuvent également être responsables d'autres infections (par exemple infections du SNC, infections respiratoires, infections génito-urinaires, infections de la peau et des tissus mous, infections ostéoarticulaires et endocardites).

Les bactéries du genre *Alistipes* sont proches des *Bacteroides* mais sont souvent pigmentées. Les espèces *Alistipes finegoldii*, *A. onderdonkii* et *A. shahii* sont souvent retrouvées dans les appendicites. Enfin, l'espèce *Bacteroides splanchnicus* a récemment été reclassée en *Odoribacter splanchnicus*.

Porphyromonas et genres apparentés

La famille des *Porphyromonadaceae* comprend 5 genres à ce jour : *Barnesiella*, *Odoribacter*, *Parabacteroides*, *Porphyromonas* et *Tannerrella*. Le genre *Porphyromonas* semble être cliniquement le plus important, dont les espèces *P. gingivalis*/*P. endodontalis* (pathogènes majeurs dans les infections buccodentaires) et *P. asaccharolytica*/*P. somerae* (espèces fréquemment retrouvées dans les infections du pied diabétique). Deux autres espèces peuvent aussi être mentionnées : *P. bennonis* et *P. catoniae*.

Au sein du genre *Parabacteroides*, l'espèce *P. distasonis* est communément retrouvée dans les infections intra-abdominales et les bactériémies, suivie de *P. goldsteinii* et *P. merdae*. À noter également le rôle de *Tannerella forsythia* en tant que pathogène majeur parodontal.

Prevotella et genre apparentés

Les espèces du genre *Prevotella* sont parmi les bactéries prédominantes de la cavité orale, et sont donc impliquées dans tout type d'infections buccodentaires. Près de 40 espèces de *Prevotella* ont été isolées chez l'homme dont la plus fréquente est *Prevotella melaninogenica*, suivie de *P. denticola*, *P. tannerae*, *P. intermedia*, *P. buccae*, *P. bivia*, *P. disiens*, *P. nigrescens* et *P. corporis*. À noter que les *Prevotella* sont retrouvées de manière persistante dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose. Enfin, elles peuvent également être responsables d'infections diverses (par exemple infections génito-urinaires, infections de la peau et des tissus mous [morsures], bactériémies).

Fusobacterium et genres apparentés

La famille des *Fusobacteriaceae* comprend 3 genres bactériens d'intérêt clinique : *Fusobacterium*, *Leptotrichia* et *Sneathia*. Cliniquement, les espèces *F. nucleatum* et *F. necrophorum* sont les plus importantes. Les autres espèces de *Fusobacterium* qui peuvent être retrouvées sont : *F. mortiferum*, *F. necrogenes*, *F. ulcerans* et *F. varium*. Toutes ces espèces ont notamment un rôle dans les infections buccodentaires et ORL mais aussi dans d'autres types (par exemple infections du SNC, infections respiratoires, infections intra-abdominales, infections de la peau et des tissus mous [morsures], bactériémies et endocardites). *F. nucleatum* est notamment retrouvé dans les abcès cérébraux et les infections maternofœtales pouvant conduire à des avortements spontanés, tandis qu'il pourrait avoir un rôle dans le cancer colorectal. Quant à lui, *F. necrophorum* est associé au syndrome de Lemierre ou nécrobacillose (sepsis secondaire à une infection oropharyngée avec thrombophlébite septique de la veine jugulaire interne et métastases septiques pulmonaires) et à environ 10 % des cas d'angines (dont l'angine fusospirillaire de Vincent).

Les espèces du genre *Leptotrichia* (*L. buccalis*, *L. goodfellowii*, *L. trevisanii* et *L. wadei*) sont des micro-organismes commensaux impliqués de façon croissante dans les bactériémies chez les patients immunodéprimés. Enfin, les espèces de *Sneathia* (*S. amnii* et *S. sanguinegens*) sont principalement retrouvées dans les infections gynécologiques.

Autres genres

Deux espèces de *Dialister* (*D. pneumosintens* et *D. invisus*), commensaux de la cavité orale, sont impliquées dans les infections buccodentaires, tandis que de nombreuses souches de *D. pneumosintens* sont retrouvées dans les infections de la peau et des tissus mous. *Selenomonas* spp. (*S. sputigena*, *S. noxia*) et *Centipeda periodontii* sont aussi des bactéries commensales de la cavité orale pouvant être responsables d'infections buccodentaires.

Les espèces *Sutterella wadsworthensis* et *Bilophila wadsworthia* sont notamment impliquées dans des infections intra-abdominales. Quelques espèces d'*Anaerobiospirillum* (*A. succiniciproducens*, *A. thomasii*) et de *Desulfovibrio* (*D. desulfuricans*, *D. fairfieldensis*, *D. piger*, *D. vulgaris*) ont été associées à des bactériémies et infections intra-abdominales chez des patients immunodéprimés.

Parmi les *Synergistetes*, trois nouvelles espèces cultivables ont été isolées à partir de prélèvements humains mais dont le rôle pathogène reste à établir : *Fretibacterium fastidiosum*, *Jonquetella anthropi* et *Pyramidobacter piscolens*.

Diagnostic bactériologique

L'examen direct après coloration de Gram peut être évocateur d'un type de bacille à Gram négatif anaérobie du fait d'une morphologie caractéristique, comme l'aspect fusiforme de *F. nucleatum* ou *Leptotrichia* spp. Comme précédemment mentionné, l'examen direct est beaucoup plus contributif que la culture pour le diagnostic de vaginose bactérienne (score de Nugent).

Les milieux de culture qui sont classiquement utilisés pour l'isolement sélectif des bacilles à Gram négatif

anaérobies sont : un milieu Schaedler au sang de mouton + néomycine-vancomycine ou Brucella au sang laqué + kanamycine-vancomycine pour l'isolement des *Bacteroides* et *Prevotella* ; un milieu *Bacteroides*-bile-esculine (BBE) pour la sélection des *Bacteroides* du groupe *fragilis* et des *Bilophila* spp. L'incubation doit se faire à 35 °C en anaérobiose pendant au moins 48 heures, mais une réincubation jusqu'à 5 à 7 jours peut être nécessaire pour certaines espèces (par exemple *Porphyromonas*, *Bilophila* et *Desulfovibrio*). À noter que les *Fusobacterium* sont parmi les anaérobies stricts les plus sensibles à l'oxygène et que leur manipulation sous air ambiant doit être la plus courte possible.

Certaines caractéristiques peuvent orienter l'identification de l'espèce, comme l'aspect des colonies de *F. nucleatum* « en miettes de pain », l'hémolyse sur sang de cheval de *F. necrophorum* ou la production de pigment de *Porphyromonas* spp. (sauf *P. catoniae*) ou de certaines espèces de *Prevotella* ou *Alistipes* (Tableau 37.4). À noter que la pigmentation varie fortement en intensité (de rose chamois à brun clair à noir) et en rapidité (2 à 21 jours) en fonction de la composition du milieu. Le profil de sensibilité à différents antibiotiques (vancomycine, kanamycine et colistine) peut aussi être très utile (Tableau 37.4). La croissance en présence de 20 % de bile est aussi un argument en faveur de *Bacteroides* du groupe *fragilis*, *Parabacteroides* et *Bilophila* (Tableau 37.4). À noter que certaines souches de *Leptotrichia* sont microaérophiles. Les genres les moins fréquents sont généralement plus difficiles à cultiver et seules les espèces des genres *Selenomonas*, *Desulfovibrio* et *Anaerobiospirillum* sont mobiles. Au niveau microscopique, *F. nucleatum* se présente comme un long bacille fusiforme aux extrémités effilées alors que *F. necrophorum* est très pléomorphe avec parfois des renflements voire des formes rondes ressemblant à des spores.

L'identification à l'espèce est généralement possible à l'aide de galeries biochimiques pour les genres les plus fréquents (*Bacteroides*, *Prevotella* et *Fusobacterium*). Cependant, à l'heure actuelle, l'identification est de plus en plus réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF qui semble une méthode fiable. Enfin, le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S reste la méthode de référence.

Sensibilité aux antibiotiques et traitement

Il y a actuellement une augmentation continue des taux de résistance parmi les bacilles à Gram négatif anaérobies, même si ceux-ci varient beaucoup selon les espèces. Les membres du groupe B. *fragilis* (en incluant aussi *P. distasonis*) sont les plus résistants.

La quasi-totalité (> 97 %) des souches du groupe B. *fragilis* expriment une céphalosporinase chromosomique (gène *cepA*) conférant une résistance naturelle aux aminopénicillines et aux céphalosporines de 1ère et 2e génération (C1G et C2G) ainsi qu'aux céphalosporines de 3e génération (C3G) orales. À noter que les C3G parentérales sont inconstamment actives. Cette α-lactamase étant naturelle, il est donc inutile de la rechercher en routine par méthode chromogénique (test à la nitrocéfine). À noter que les souches sauvages sont sensibles à la ticarcilline et à la pipéracilline et que CepA est fortement inhibée par les inhibiteurs de α-lactamases. Ces souches peuvent acquérir une résistance à la céfoxitine (gène *cfxA*) ou aux carbapénèmes (gène *cfiA*). Les souches résistantes aux carbapénèmes par production

Tableau 37.4 **Caractéristiques générales des principaux bacilles à Gram négatif anaérobies.**

Genre	Morphologie du bacille	Mobilité	Production de pigment	Croissance sur 20 % de bile	Sensibilité à :		
					Vancomycine (5 µg)	Kanamycine (1000 µg)	Colistine (10 µg)
Bacteroides	Court	–	–	+	R	R	R
Alistipes	Court	–	V	V	R	R	R
Odoribacter	Pléomorphe	–	–	V	R	R	R
Porphyromonas	Variable	–	+	–	S	R	R
Parabacteroides	Court	–	–	+	R	R	R
Tannerella	Pléomorphe	–	–	–	R	S	S
Prevotella	Coccobacille	–	V	–	R	V	V
Fusobacterium	Variable	–	–	V	R	S	S
Leptotrichia/Sneathia	Variable	–	–	–	R	S	S
Dialister	Coccoïde	–	–	–	R	S	V
Selenomonas	Incurvé	+	–	–	R	S	V
Sutterella	Droit	–	–	V	R	S	S
Bilophila	Droit	–	–	+	R	S	S
Desulfovibrio	Incurvé	+	+	V	R	S	R
Anaerobiospirillum	Long, spiralé	+	–	V	R	S	V

+, réaction positive ; –, réaction négative ; v, réaction variable ; R, résistant (diamètre < 10 mm) ; S, sensible (diamètre ≥ 10 mm) ; v, sensibilité variable.

de la métallo-β-lactamase CfiA (< 3 %) doivent être rendues résistantes à l'ensemble des β-lactamines, y compris associées aux inhibiteurs de β-lactamases. Une hyperproduction de la β-lactamase associée ou non à un défaut de perméabilité peut être retrouvée avec une résistance possible aux associations pénicillines–inhibiteurs de β-lactamases. Cependant, plus de 90 % des souches restent sensibles à l'association pipéracilline–tazobactam. Il existe une résistance de haut niveau à la clindamycine dans 30 à 40 % des souches. De rares souches présentant une sensibilité diminuée au métronidazole ont été décrites (CMI de 4 à 16 mg/l au lieu de 0,25 à 2 mg/l). C'est dû à la présence de gènes chromosomique (*nimB*) ou plasmidiques (*nimA*, *nimC* à *nimJ*). Plus de 90 % des souches sont sensibles à la moxifloxacine tandis que l'activité in vitro de la tigécycline est variable.

Seules de rares souches de *P. asaccharolytica* sont résistantes aux aminopénicillines par production de β-lactamase. Il n'y a pas de résistance connue aux associations β-lactamine–inhibiteur de β-lactamases, tandis que la résistance à la clindamycine et au métronidazole est exceptionnelle. Les souches sont sensibles à la moxifloxacine et à la tigécycline. À noter que les *Porphyromonas* spp. sont sensibles aux glycopeptides.

Les souches de *Prevotella* sont naturellement très sensibles aux pénicillines, mais environ 60 à 75 % des souches produisent une β-lactamase acquise qui inactive aminopénicillines, C1G, C2G et C3G orales. L'activité est restaurée lors de l'association avec un inhibiteur de β-lactamases. Aucune souche n'est résistante aux carbapénèmes. Les résistances à la clindamycine et au métronidazole sont très rares. Enfin, la moxifloxacine et la tigécycline sont actives in vitro.

Les espèces de *Fusobacterium* sont très sensibles aux antibiotiques et moins de 5 % des souches produisent une β-lactamase qui inactive amino-, carboxy- et uréidopénicillines. L'activité est restaurée lors de l'association avec un inhibiteur de β-lactamases.

Une majorité des souches de *B. wadsworthia* produisent une β-lactamase conférant une résistance à l'amoxicilline et à la pipéracilline, mais les associations β-lactamine–inhibiteur de β-lactamases, la céfoxitine, les carbapénèmes la clindamycine et le métronidazole sont généralement actifs.

37.5 Cocci à Gram positif anaérobies

C. Isnard, F. Guérin, V. Cattoir

Généralités

Les cocci anaérobies à Gram positif (*Gram-positive anaerobic cocci* [GPAC]) sont parmi les bactéries anaérobies les plus fréquemment isolées dans les prélèvements cliniques. Longtemps regroupés au sein des genres *Peptococcus* et *Peptostreptococcus*, de nombreuses modifications taxonomiques ont eu lieu et les GPAC sont actuellement répartis en 16 genres : *Anaerococcus*, *Anaerosphaera*, *Atopobium*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Fastidiosipila*, *Finegoldia*, *Gallicola*, *Murdochiella*, *Parvimonas*, *Peptococcus*, *Peptoniphilus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Sarcina* et *Slackia*. Ce sont tous des cocci (quelque fois allongés) à Gram positif, anaérobies stricts, non sporulés et arrangés en paires, tétrades, amas ou chaînettes.

Habitat et pouvoir pathogène

Les GPAC font partie du microbiote humain au niveau de la cavité orale, des voies respiratoires supérieures, des tractus intestinal et vaginal et de la peau. Ce sont des pathogènes opportunistes responsables d'infections diverses, notamment infections de la peau et des tissus mous, infections ostéoarticulaires (notamment sur prothèses), infections buccodentaires et ORL, infections gynécologiques et infections intra-abdominales. Ils peuvent également être associés à des infections sévères comme des abcès cérébraux, des bactériémies et endocardites ou des pneumonies nécrosantes.

À noter que les GPAC sont le groupe de bactéries anaérobies strictes le plus fréquemment isolé des prélèvements cliniques (25 à 30 %), dont les espèces majeures sont : *Finegoldia magna* (23 à 34 %), *Parvimonas micra* (16 à 23 %), *Peptoniphilus harei* (4 à 14 %) et *Peptostreptococcus anaerobius* (3 à 10 %). Aussi, la plupart des infections dues à GPAC sont polymicrobiennes, même si de nombreux cas d'infections monomicrobiennes ont été documentés, notamment dus à *F. magna*. Les autres espèces moins fréquemment retrouvées sont : *Peptoniphilus asaccharolyticus*, *P. indolicus*, *P. ivorii*, *Anaerococcus prevotii*, *A. vaginalis*, *A. lactolyticus* et *A. tetradius*.

Diagnostic bactériologique

Les GPAC ne sont pas extrêmement sensibles à l'oxygène et cultivent assez bien sur les milieux de type Brucella, Columbia ou Schaedler supplémentés avec 5 % de sang de mouton, sans hémine ni vitamine K_1. Quelques caractères peuvent orienter l'identification comme la taille des cocci à la coloration de Gram (petite pour *P. micra* [0,3–0,7 μm] et grosse pour *F. magna* [0,8–1,6 μm]), l'aspect très polymorphe avec des formes coccobacillaires souvent regroupées en courtes chaînettes de *P. anaerobius*. Outre les taxodisques (vancomycine 5 μg, kanamycine 1000 μg et colistine 10 μg) qui peuvent distinguer les cocci à Gram positif et négatif anaérobies, les galeries biochimiques permettent d'identifier les principales espèces. Un test utilisant un disque de métronidazole permet également de différencier les GPAC de certaines souches de *Streptococcus*. Enfin, la spectrométrie de masse MALDI-TOF semble tout à fait fiable pour l'identification des GPAC, par comparaison à la méthode de référence de séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.

Sensibilité aux antibiotiques et traitement

Les GPAC sont généralement sensibles aux β-lactamines (avec une sensibilité constante à l'association pipéracilline–

tazobactam, à la céfoxitine et aux carbapénèmes), à la vancomycine, au linézolide et au métronidazole. Des taux de résistance assez élevés (jusqu'à 30 à 40 %) ont pu être observés pour l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline alors qu'il existe une sensibilité constante vis-à-vis de la tigécycline.

37.6 Cocci à Gram négatif anaérobies

C. Isnard, F. Guérin, V. Cattoir

Généralités

Les bactéries appartenant au groupe des cocci à Gram négatif anaérobies (*Gram-negative anaerobic cocci* [GNAC]) font partie des genres *Veillonella*, *Acidaminococcus*, *Megasphaera*, *Anaeroglobus* et *Negativicoccus*. À la coloration de Gram, ces cocci à Gram négatif sont généralement regroupés par paires. Ils sont aussi immobiles et non sporulés.

Habitat et pouvoir pathogène

Les GNAC font partie du microbiote humain au niveau oral, respiratoire, intestinal et génito-urinaire. À noter que les espèces du genre *Veillonella* représentent 5 à 10 % des bactéries de la flore salivaire. Seule l'espèce *V. parvula* semble avoir un intérêt clinique, ayant été retrouvée en association dans différentes infections (par exemple maladie parodontale, infections de la tête et du cou, infections respiratoires, infections de la peau et des tissus mous après morsure). Les autres espèces de *Veillonella* retrouvées chez l'homme mais dont le rôle pathogène n'est pas établi sont : *V. atypica*, *V. dispar*, *V. montpellierensis* et *V. rogosae*.

Diagnostic bactériologique

Les espèces du genre *Veillonella* sont des cocci de petite taille (0,3 à 0,7 µm) groupés par deux ou en amas. L'identification fondée sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF semble donner des résultats variables mais peu d'isolats ont été testés à ce jour.

Sensibilité aux antibiotiques et traitement

La plupart des souches de *Veillonella* sont sensibles à l'ensemble des β-lactamines. La clindamycine est le plus souvent très active. Enfin, de très rares souches résistantes au métronidazole ont été rapportées.

Pour en savoir plus

Alauzet C, Marchandin H, Lozniewski A. New insights into Prevotella diversity and medical microbiology. Future Microbiol 2010 ; 5 : 1695–718.

Barbut F, Eckert C, Lalande V, Le Monnier A. Clostridium difficile. In : Référentiel en microbiologie médicale (Rémic). 5e éd. Paris : Société française de microbiologie ; 2015.

Biswas S, Rolain JM. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that difficult to culture. J Microbiol Meth 2013 ; 92 : 14–24.

Bland S, Sédallian A, Dubreuil L. Clostridium autres que C. In : Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2007.

Blondiaux N, Sédallian A, Dubreuil L. Bacilles anaérobies à Gram négatif. In : Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2014.

Boscano N, Belibasakis GN. Porphyromonas gingivalis : an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. FEMS Microbiol Rev 2012 ; 333 : 1–9.

Boyanova L, Kolarov R, Mitov I. Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. Anaerobe 2015 ; 31 : 4–10.

Brazier JS. Human infections with Fusobacterium necrophorum. Anaerobe 2006 ; 12 : 165–72.

Cattoir V. Actinobaculum schaalii : Review of an emerging uropathogen. J Infect 2012 ; 64 : 260–7.

Dubreuil L. Méthodes d'étude des anaérobies. In : Antibiogramme. 3e éd. Paris : ESKA ; 2012.

Dubreuil L. Anaérobies à Gram négatif. In : Antibiogramme. 3e éd. Paris : ESKA ; 2012.

Dubreuil L, Sédallian A, Marchandin H. Cocci anaérobies à Gram positif. In : Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2014.

Eckert C, Lalande V, Barbut F, et al. Colites à Clostridium difficile. Revue Prat 2015 ; 65 : 21–5.

Hall V, Copsey SD. Propionibacterium, Lactobacillus, Actinomyces, and other non-spore-forming anaerobic Gram-positive rods. In : Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington, DC : ASM Press ; 2015.

Han YW. Fusobacterium nucleatum : a commensal-turned pathogen. Curr Opin Microbiol 2015 ; 23 : 141–7.

Könönen E, Conrads G, Nagy E. Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium, and other anerobic Gram-negative rods. In : Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington, DC : ASM Press ; 2015.

Könönen E, Wade WG. Actinomyces and related organisms in human infections. Clin Microbiol Rev 2015 ; 28 : 419–42.

Lessa FC, Mu Y, Bamberg WM, et al. Burden of Clostridium difficile infection in the United States. N Engl J Med 2015 ; 372 : 825–34.

Mahlen SD, Clarridge JE. Site and clinical significance of Alloscardovia omnicolens and Bifidobacterium species isolated in the clinical laboratory. J Clin Microbiol 2009 ; 47 : 3289–93.

Marchandin H. Cocci anaérobies à Gram négatif. In : Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2014.

Murdoch DA. Gram-positive anaerobic cocci. Clin Microbiol Rev 1998 ; 11 : 81–120.

Murphy EC, Frick IM. Gram-positive anaerobic cocci commensals and opportunistic pathogens. FEMS Microbiol Rev 2013 ; 37 : 520–53.

Nagy E. Anaérobies. In : Référentiel en microbiologie médicale (Rémic). 5e éd. Paris : Société française de microbiologie ; 2015.

Pons JL, Barbut F. In : Antibiogramme. 3e éd. Anaérobies à Gram positif. Paris : ESKA ; 2012.

Schuetz AN, Hecht DW. Susceptibility test methods : Anaerobic bacteria. In : Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington, DC : ASM Press ; 2015.

Sédallian A, Dubreuil L. Généralités sur les bactéries anaérobies. In : Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2014.
Sédallian A, Marchandin H, Dubreuil L. Anaérobies à Gram positif non sporulés. In : Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris : ESKA ; 2014.
Song Y, Finegold SM. Peptostreptococcus, Finegoldia, Anaerococcus, Peptoniphilus, Veillonella, and other anerobic cocci. In : Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington, DC : ASM Press ; 2015.
Stevens DL, Bryant AE, Carroll K. Clostridium. In : Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington, DC : ASM Press ; 2015.
Wexler HM. Bacteroides : the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. Clin Microbiol Rev 2007 ; 20 : 593–621.

Chapitre 38

Instauration et surveillance d'un traitement antibiotique

O. Barraud, N. Hidri, M.-C. Ploy, V. Cattoir

PLAN DU CHAPITRE

Différents critères bactériologiques, pharmacocinétiques, pharmacodynamiques, toxicologiques, écologiques et économiques sont à considérer dans le choix d'un traitement antibiotique.

L'étude de l'activité des antibiotiques sur les bactéries rencontrées en pathologie constitue une étape nécessaire au choix d'une antibiothérapie. L'évaluation de cette activité nécessite une étude in vitro réalisée au laboratoire de bactériologie.

Les antibiotiques actuellement disponibles sont définis selon un spectre naturel d'activité, c'est-à-dire la liste des espèces bactériennes sur lesquelles ils sont normalement actifs. Certains antibiotiques ont un spectre large, comme les β-lactamines ou les fluoroquinolones qui agissent aussi bien sur les bactéries à Gram négatif que celles à Gram positif, et d'autres ont un spectre plus étroit comme les glycopeptides qui n'agissent que sur les bactéries à Gram positif.

Outre la résistance naturelle (ou intrinsèque) présente chez toutes les souches d'une espèce bactérienne, les bactéries ont su développer au cours du temps des résistances dites « acquises ». Dans ce dernier cas, seules certaines souches au sein d'une espèce expriment la résistance, qui n'est donc pas prévisible comme la résistance naturelle.

Cette résistance peut être due à des mutations affectant des gènes présents sur le chromosome ou à l'acquisition de gènes étrangers, le plus souvent par le transfert horizontal d'éléments génétiques tels que les plasmides ou les transposons.

La fréquence de souches résistantes à un antibiotique au sein d'une espèce bactérienne, par acquisition de résistance, est parfois élevée (par exemple environ la moitié des souches d'*Escherichia coli* isolées en France sont résistantes à l'amoxicilline). Il est donc nécessaire d'évaluer in vitro la sensibilité des bactéries aux antibiotiques afin d'aider le clinicien dans son choix thérapeutique.

Bactériostase et bactéricidie

Définition

Les interactions bactérie/antibiotique dans le temps, en présence de concentrations croissantes d'antibiotique, peuvent se traduire soit par un ralentissement de la croissance bactérienne (bactériostase), soit par un effet létal de l'antibiotique (bactéricidie) (Fig. 38.1).

La bactériostase est quantifiée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la bactéricidie par la concentration minimale bactéricide (CMB), les deux concentrations étant exprimées en mg/l.

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu, après 16 à 24 heures d'incubation, de la souche bactérienne étudiée.

La CMB est la plus faible concentration d'antibiotique laissant après 16 à 24 heures d'incubation un pourcentage de survivants ≤ 0,01 % (soit $-4\ Log_{10}$) de l'inoculum de départ

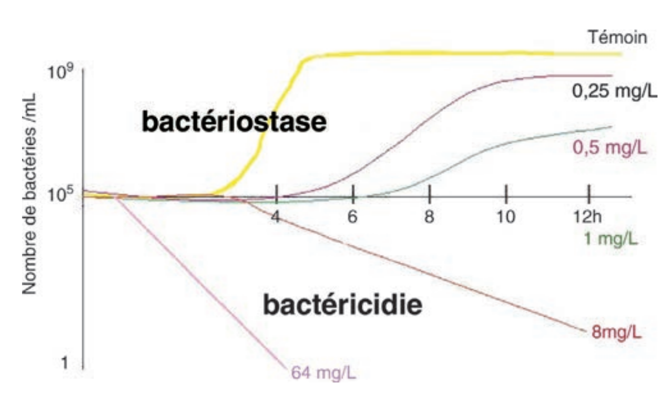


Fig. 38.1 Courbes de croissance d'un inoculum bactérien en présence d'antibiotique en concentrations croissantes.

(≤0,1 % [soit −3 Log_{10}] chez les Anglo-Saxons). Un antibiotique est bactéricide si la CMI et la CMB sont proches. Si le rapport CMB/CMI ≥ 32, l'antibiotique est bactériostatique, ou s'il s'agit d'un antibiotique habituellement considéré comme bactéricide, la souche est dite tolérante.

Étude de la bactériostase

La CMI peut être déterminée par différentes méthodes selon des recommandations américaines (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]) ou européennes (European Committee on Antimicrobial Susceptiblity Testing [EUCAST]). À noter qu'il y a à l'heure actuelle une harmonisation entre les recommandations françaises du CA-SFM et de celles de l'EUCAST.

Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide

La CMI peut être déterminée par macrodilution (en tubes, avec un volume final 1 ml [souvent 2 ml]) ou par microdilution (en microplaques de 96 puits, avec un volume final de 100 litres) en milieu liquide. Cette dernière technique constitue la méthode de référence internationale (norme ISO 20776-1) pour les bactéries aérobies non exigeantes.

Une série de tubes ou de puits est ensemencée avec 5 à 10^5 UFC/ml de la bactérie à étudier en bouillon Mueller-Hinton (MH) à teneur ajustée en ions Ca^2+ (25 à 50 mg/l) et Mg^2+ (12,5 à 25 mg/l). Ensuite, des quantités croissantes d'antibiotiques sont ajoutées de façon à réaliser une gamme de concentrations en progression géométrique de raison 2. Un tube sans antibiotique servira de témoin (Fig. 38.2).

Après 16 à 24 heures d'incubation en aérobiose à environ 35 °C, la CMI correspond à la concentration d'antibiotique présente dans le premier tube ou puits où il n'y a pas de culture visible.

À noter que pour les bactéries exigeantes (par exemple *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Campylobacter* spp., *Corynebacterium* spp.), le CA-SFM/EUCAST recommande la méthode de microdilution en bouillon MH-F. Ce milieu MH est enrichi avec 5 % de sang de cheval lysé et 20 mg/l de -nicotinamide adénine dinucléotide (-NAD).

Alors que la méthode de macrodilution est peu employée en routine du fait de sa lourdeur, celle de microdilution est très utilisée car très pratique et automatisable.

Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé

Le principe est identique à celui de la dilution en milieu liquide, mais cette fois-ci l'antibiotique est incorporé dans la gélose MH ou MH-F. Ainsi, chaque boîte de Petri correspond à une concentration donnée d'antibiotique. Il est possible de tester ainsi sur plusieurs souches déposées sous forme de spot sur la même série de boîtes avec un inoculum de 10^4 UFC/spot (Fig. 38.3). La CMI correspond alors à la concentration d'antibiotique présente dans la première boîte où la culture bactérienne n'est pas visible après une incubation de 16 à 24 heures en aérobiose à environ 35 °C.

Alors que cette méthode est bien standardisée et fiable, elle nécessite un temps et une main-d'œuvre importants, notamment pour la préparation des boîtes.

Détermination de la CMI par diffusion en milieu gélosé

Une autre approche est d'utiliser des bandelettes de plastique imprégnées d'un gradient prédéfini de concentrations croissantes d'antibiotique. C'est le principe utilisé dans les méthodes commercialisées E-tests® (bioMérieux) et MICE Tests® (Oxoid) (Fig. 38.4).

Ces bandelettes sont appliquées directement à la surface d'une gélose inoculée avec la bactérie (selon les recommandations du fabricant, généralement avec une suspension de 0,5 McFarland). Le gradient préformé exponentiel d'antibiotique est immédiatement transféré sur la gélose (quelques

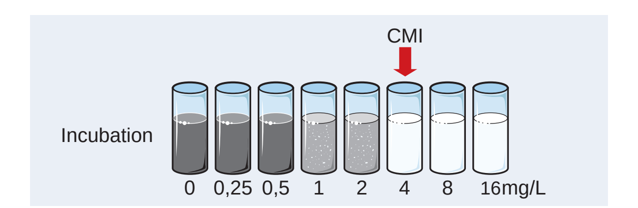


Fig. 38.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide.

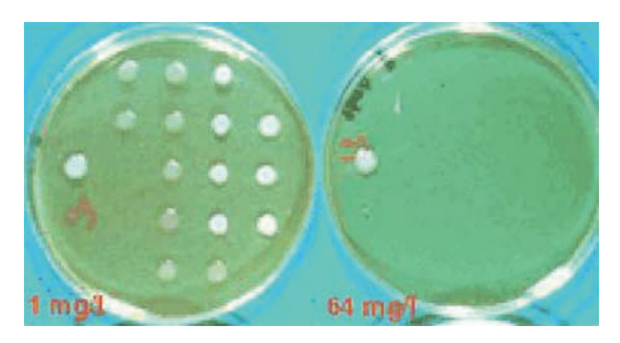


Fig. 38.3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide par dilution en gélose.



Fig. 38.4 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide par diffusion en gélose (technique E-Test®).

secondes). Après incubation de 16 à 24 heures à environ 35 °C, une zone d'inhibition ellipsoïdale symétrique centrée le long de la bandelette se forme (Fig. 38.4).

La CMI des antibiotiques bactéricides correspond à la concentration d'antibiotique lisible au point où l'ellipse croise la bandelette (100 % d'inhibition). Pour les antibiotiques bactériostatiques, une zone de traîne se forme au niveau de l'ellipse. La lecture de la CMI correspond à 80 % d'inhibition, avec prise en compte des macrocolonies (les microcolonies sont occultées).

Cette technique est facile à réaliser en routine et permet d'obtenir des CMI avec une bonne concordance avec les CMI réalisées par dilution en milieu gélosé, pour la plupart des espèces bactériennes et des antibiotiques. Elle est très utilisée en routine, notamment pour l'étude de la sensibilité de *S. pneumoniae* aux β-lactamines, et est utilisable pour certaines bactéries à croissance difficile (par exemple anaérobies, *Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae*). Un des inconvénients principaux est son coût.

Étude de la bactéricidie

Détermination de la CMB en milieu liquide

Dans un premier temps, une gamme de concentrations d'antibiotique est réalisée comme pour la détermination de la CMI. Le même jour, une numération de l'inoculum de départ est effectuée en réalisant 4 dilutions successives de 10 en 10 qui seront chacune ensemencées en strie à l'aide d'une anse calibrée sur une gélose MH. Cette gélose est incubée 16 à 24 heures à environ 35 °C, puis les colonies seront dénombrées et le nombre d'unités formant colonie (UFC) à la dilution au 1/10 000ᵉ correspondra à 0,01 % de l'inoculum de départ (ou à la dilution au 1/1000ᵉ soit 0,1 % chez les Anglo-Saxons). Après 16 à 24 heures à environ 35 °C, tous les tubes qui ont une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la CMI seront repiqués sur gélose MH en stries à l'aide d'une anse calibrée (même volume que pour la numération de l'inoculum de départ). Après 16 à 24 heures à environ 35 °C, les colonies présentes sur chaque strie sont comptées, cette numération étant comparée à la numération de l'inoculum de départ (Fig. 38.5).

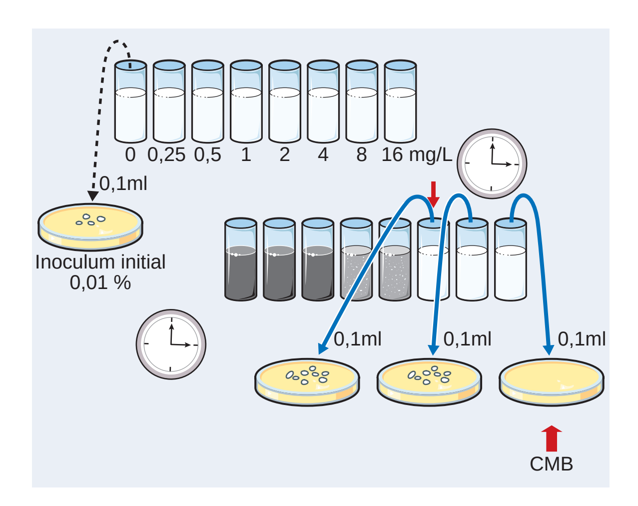


Fig. 38.5 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) en milieu liquide.

La CMB est la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle le nombre de colonies bactériennes est inférieur ou égal au nombre de colonies présentes sur la dilution de l'inoculum de départ au 1/10 000ᵉ (c'est-à-dire ≤ 0,01 % de l'inoculum de départ) ou au 1/1000ᵉ (soit ≤ 0,1 % de l'inoculum de départ) chez les Anglo-Saxons.

À noter que la détermination de la CMB peut aussi être réalisée en microplaques 96 puits.

Cinétique de bactéricidie

La détermination de la vitesse de bactéricidie (*time kill curves* des Anglo-Saxons) peut être étudiée. Elle consiste à suivre avec repiquages à intervalles réguliers (par exemple 0, 3, 6, 12 et 24 heures) les bactéries survivantes. De fait de sa lourdeur, elle n'est pratiquement jamais utilisée en routine.

Antibiogramme

La détermination des CMI en méthode manuelle est fastidieuse à réaliser, et l'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques en routine est effectuée grâce à la technique de l'antibiogramme.

Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé

L'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé repose sur le principe de la compétition entre la croissance d'une bactérie et la diffusion d'un antibiotique dans un milieu gélosé à partir d'un support papier pré-imprégné.

Des disques de papier pré-imprégnés d'une charge connue d'antibiotiques sont déposés à la surface d'une gélose ensemencée avec la bactérie à étudier. L'antibiotique diffuse de façon radiale à partir du disque de papier selon un gradient de concentration décroissant. Après 16 à 24 heures d'incubation à environ 35 °C, une zone d'inhibition centrée sur le disque se forme ; la concentration d'antibiotique en bordure de la zone d'inhibition correspond à la CMI de l'antibiotique pour la souche étudiée.

Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en millimètres et des courbes de concordance diamètre/CMI sont réalisées (Fig. 38.6). Ces courbes ont été établies pour chaque antibiotique à partir d'échantillons représentatifs des différentes espèces bactériennes ; elles ne sont valables que si tous les paramètres sont rigoureusement contrôlés.

La gélose utilisée est une gélose MH (Encadré 38.1) et son épaisseur doit être d'environ 4 mm. La composition du milieu gélosé est importante car des modifications de composition peuvent avoir des conséquences sur le résultat des tests de sensibilité pour certains antibiotiques. Le milieu MH-F, contenant 5 % de sang de cheval lysé et 20 mg/l de -NAD, doit être utilisé pour les bactéries exigeantes (par exemple *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Campylobacter* spp., *Corynebacterium* spp.).

Afin d'obtenir des résultats reproductibles et comparables, cette technique a été très bien standardisée, et le respect des conditions d'inoculum, de milieu, de temps et d'atmosphère d'incubation est primordial. Selon les recommandations récentes du CA-SFM/EUCAST, l'inoculum correspond à une suspension bactérienne de 0,5 McFarland

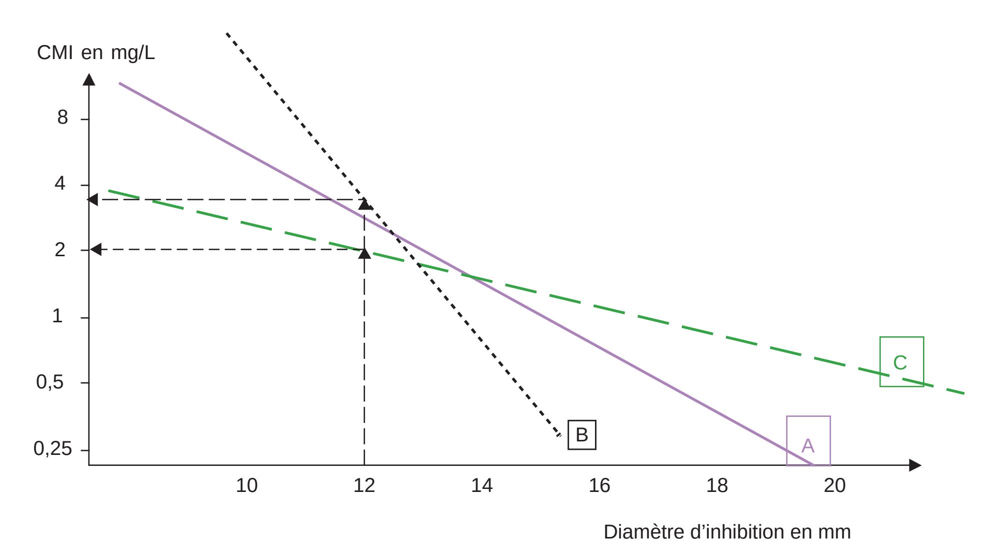


Fig. 38.6 Courbes de concordance diamètre d'inhibition–CMI pour trois antibiotiques A, B et C.

Encadré 38.1 Gélose Mueller-Hinton

- Formule : en g/l d'eau distillée
- Macération de viande de bœuf : 300 ml
- Hydrolysat de caséine : 17,5 G
- Amidon : 1,5 G
- Agar : 10 G
- pH : 7,2–7,4

(soit 1 à 2.10[8] UFC/ml), l'ajustement à l'aide d'un spectrophotomètre étant recommandé. L'inoculum doit être calibré afin d'obtenir des colonies confluentes. L'ensemencement de la gélose est réalisé par écouvillonnage (manuellement dans trois directions différentes ou à l'aide d'un ensemenceur rotatif). Les géloses ensemencées sont incubées à environ 35 °C pendant 16 à 24 heures en position renversée (couvercle en bas) en aérobiose (par exemple entérobactéries, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp.), sous 4 à 6 % de CO_2 (par exemple *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Corynebacterium* spp.) ou en microaérophilie (par exemple *Campylobacter* spp.).

Après incubation, les diamètres sont mesurés (en mm) soit manuellement à l'aide d'un pied à coulisses, soit grâce à des systèmes automatisés de lecture, tels que SIR Scan® (I2A), BIOMIC V3® (Giles Scientific), Aura Image® (Oxoid), Mastacan Elite® (MAST) et Osiris® (Bio-Rad).

La méthode de diffusion en milieu gélosé présente de nombreux avantages : simplicité, reproductibilité, flexibilité, coût faible, pas d'équipement spécialisé, etc. En revanche, seul un résultat qualitatif en catégorisation clinique est rendu au clinicien (voir ci-dessous) tandis que certains antibiotiques, ne peuvent pas être testés par cette méthode (par exemple glycopeptides, daptomycine, polymyxines).

Méthodes semi-automatisées en milieu liquide

Certains automates, fondés sur la croissance des bactéries en milieu liquide, sont largement utilisés en routine pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. Des cartes à micropuits contenant une gamme de concentration par antibiotique sont inoculées avec la suspension bactérienne, et une lecture spectrophotométrique ou turbidimétrique est faite de manière itérative ou continue. Selon le système, les résultats fournis correspondent à des CMI « vraies » ou à des estimations de celles-ci.

Quatre automates principaux sont commercialisés : le Phoenix® (Becton Dickinson), le Vitek 2® (bioMérieux), le Microscan WalkAway® (Siemens) et le Sensititre ARIS® (Thermo Scientific).

L'utilisation de ces automates présente de nombreux avantages (temps manuel réduit, rapidité [4 à 16 heures], reproductibilité, système expert, transmission des résultats), même si quelques inconvénients sont à noter, comme le coût de l'équipement et des consommables, le caractère « fermé » du système et le problème de détection de certains phénotypes de résistance.

Contrôle de qualité

À cause de multiples causes d'erreur pouvant fausser les résultats de l'antibiogramme, un contrôle de qualité doit être organisé pour chacune des techniques utilisées dans le laboratoire. Le CA-SFM/EUCAST recommande d'utiliser plusieurs souches de contrôle de qualité interne, par exemple : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Un contrôle est souhaitable de façon hebdomadaire et/ou à chaque changement de lot de réactif ou opération de maintenance importante sur automate.

Interprétation en catégorisation clinique

La réponse au clinicien se fera en termes de probabilités d'activité, l'antibiogramme étant un test de prédiction de succès ou d'échec clinique.

Les résultats seront rendus au clinicien soit « S » (sensible), « I » (intermédiaire) ou « R » (résistant) :

- le résultat « R » signifie que le risque d'échec thérapeutique est grand quel que soit le traitement ;

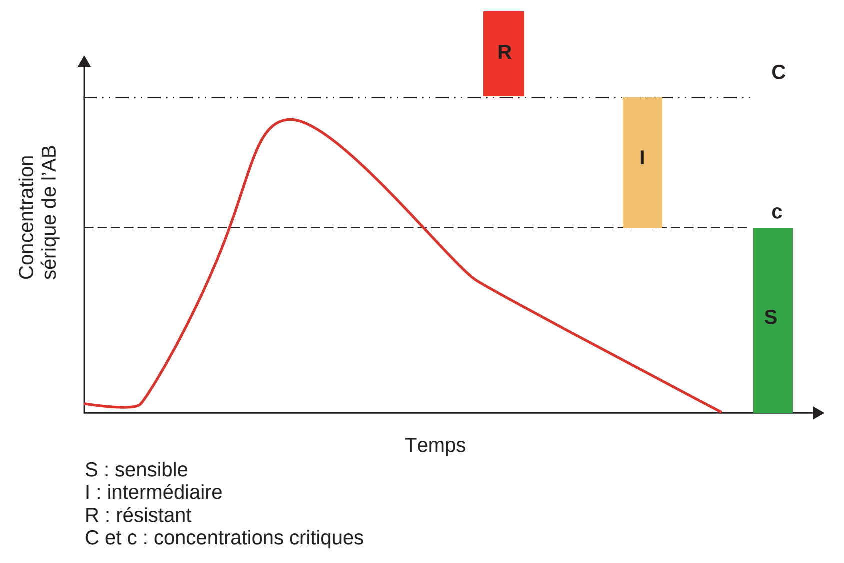


Fig. 38.7 Interprétation clinique des données de l'antibiogramme.

- le résultat « S » signifie qu'il n'y a pas de mécanisme de résistance acquise exprimé in vitro. La probabilité de succès thérapeutique est forte, à condition que les autres paramètres pharmacologiques (diffusion au site de l'infection), toxicologiques et cliniques soient pris en compte ;
- le résultat « I » correspond à une zone d'incertitude qui ne peut pas prédire du succès ou de l'échec thérapeutique.

Ces catégorisations cliniques sont définies en comparant les résultats de CMI obtenus avec des concentrations critiques définies selon des critères bactériologiques (distribution de CMI), pharmacologiques (pharmacocinétique et pharmacodynamie) et cliniques (réponse clinique et éradication microbiologique). En France, les concentrations critiques sont édictées par le CA-SFM, conformément aux recommandations faites par l'EUCAST. À noter que **la plupart des concentrations critiques sont encore établies pour des concentrations sériques obtenues après des posologies usuelles** (Fig. 38.7), mais on tend actuellement à évoluer vers une réponse interprétative tenant compte du site de l'infection. Enfin, grâce aux courbes de concordance, aux concentrations critiques correspondent des diamètres critiques.

Tests phénotypiques complémentaires

Même si l'antibiogramme fournit de nombreuses informations, des tests additionnels peuvent parfois être nécessaires afin de mettre en évidence l'ensemble des mécanismes de résistance.

C'est le cas de la **détection de la pénicillinase** à l'aide d'un substrat chromogénique (disque de nitrocéfine) chez *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis, Neisseria gonorrhoeae* et certains anaérobies à Gram négatif. À noter que ce test n'est plus recommandé par le CA-SFM/EUCAST pour la production de β-lactamase chez les staphylocoques.

Devant une souche d'entérobactérie résistante aux céphalosporines de 3e/4e génération (C3G/C4G), la **recherche d'une BLSE (β-lactamase à spectre étendu)** doit systématiquement être effectuée à des fins de contrôle des épidémies, la présence d'une telle enzyme n'interférant pas sur la catégorisation clinique. Cette recherche doit notamment permettre de différencier la production d'une BLSE d'une hyperproduction de céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique).

Pour la mise en évidence d'une BLSE, l'utilisation d'un test de synergie entre un ou plusieurs antibiotiques de type C3G/C4G et un inhibiteur de β-lactamase (par exemple acide clavulanique) est préconisée. La présence d'une BLSE est affirmée par des images de synergie à type de « bouchons de champagne » (Fig. 38.8). La recherche peut également se faire à l'aide de disques combinés (C3G/C4G ± acide clavulanique, avec un test positif en cas d'augmentation ≥ 5 mm du diamètre d'inhibition en présence d'inhibiteur) (Fig. 38.9), ou par mesure de la CMI des C3G/C4G ± acide clavulanique (test positif en cas de diminution d'au moins 3 dilutions de la CMI en présence d'inhibiteur). En cas d'hyperproduction de céphalosporinase, une restauration de la sensibilité aux C3G en présence de 250 mg/l de cloxacilline (inhibiteur de céphalosporinase) est observée. Ce test est notamment utile pour « démasquer » la présence d'une BLSE au sein d'une souche hyperproductrice de céphalosporinase (par exemple *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*) (Fig. 38.10).

Depuis peu, l'émergence de souches d'**entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC)** est rapportée au niveau mondial. Comme pour les BLSE, la présence de carbapénémase n'interfère pas sur la catégorisation clinique, mais leur détection est nécessaire sur le plan épidémiologique pour surveiller et contrôler leur diffusion. Une recherche de carbapénémase doit être systématiquement pratiquée sur toute souche de sensibilité diminuée (I ou R) à au moins l'un des carbapénèmes. Différents tests phénotypiques de confirmation existent, tout en sachant que le test de Hodge modifié n'est plus recommandé car difficile à standardiser (nombreux faux positifs et faux négatifs). Différents inhibiteurs peuvent être utilisés pour mettre en évidence la présence d'une carbapénémase de classe A type KPC (par exemple acide clavulanique, acide boronique et dérivés) ou de classe B type NDM, VIM ou IMP

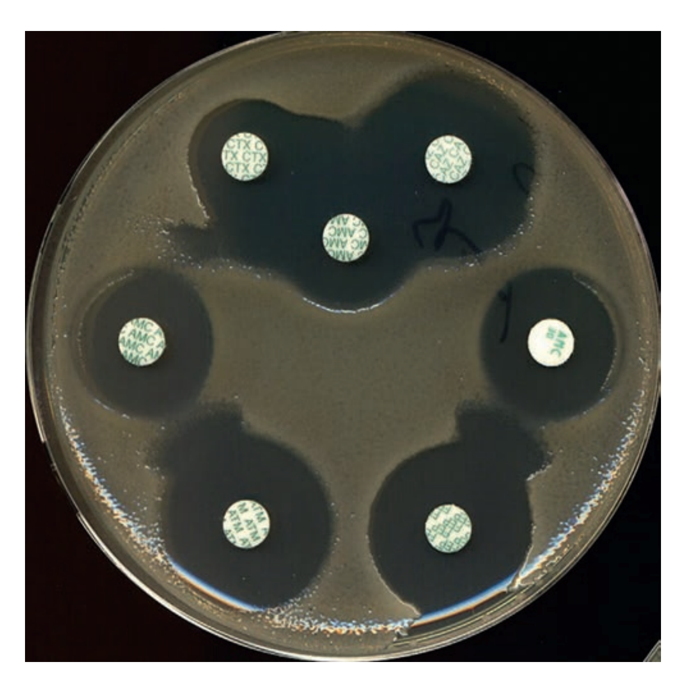


Fig. 38.8 Images de synergie entre disques de céfotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), céfépime (FEP), aztréonam (ATM) et d'amoxicilline–acide clavulanique (AMC). Antibiogramme d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* producrice de BLSE de type CTX-M. *(Photographies : M. Auzou.)*

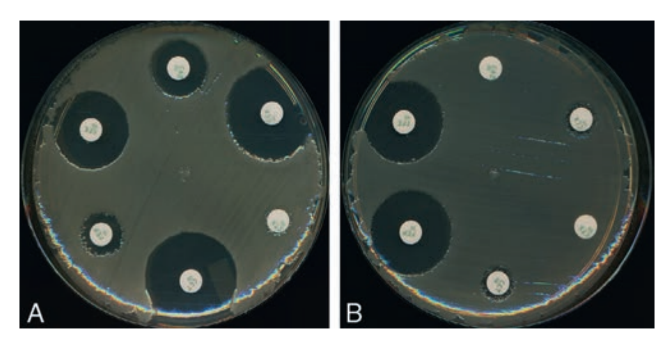
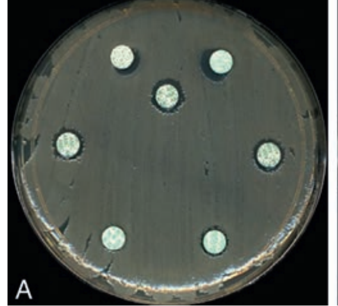


Fig. 38.9 Recherche de BLSE positive (A) et négative (B) avec la méthode des disques combinés. CTX : céfotaxime ; CCT : céfotaxime + acide clavulanique ; CAZ : ceftazidime ; CCA : ceftazidime + acide clavulanique ; FEP : céfépime ; CFE : céfépime + acide clavulanique. *(Photographies : M. Auzou.)*

(par exemple EDTA, acide dipicolinique, acide 2-mercaptopropionique) (Fig. 38.11). À noter qu'une résistance à la témocilline permet la reconnaissance de carbapénémase de classe D type OXA-48. Des techniques reposant sur la détection de l'hydrolyse des carbapénèmes sont également disponibles : la colorimétrie (par exemple Carba NP test®) ou par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Dans la méthode colorimétrique, l'hydrolyse de la molécule entraîne une acidification du milieu responsable du virage de couleur d'un indicateur de pH (par exemple rouge de phénol) (Fig. 38.12). Dans la méthode spectrométrique, l'hydrolyse de la molécule est directement détectée par la mise en évidence des métabolites du carbapénème testé.

Il existe également des tests recommandés pour les bactéries à Gram positif. Par exemple, devant toute souche de *Staphylococcus* spp. résistante à l'érythromycine et sensible



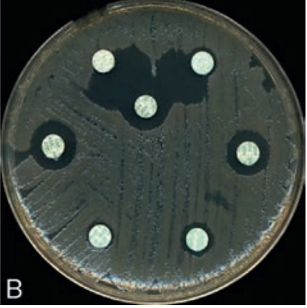
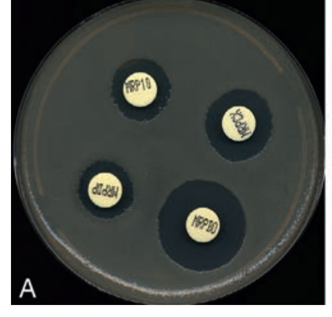


Fig 38.10 Recherche de BLSE sur MH (A) et sur MH + cloxacilline (250 mg/l) (B) chez une souche d'*Enterobacter cloacae* hyperproductrice de céphalosporinase chromosomique et productrice de BLSE. CTX : céfotaxime ; CAZ : ceftazidime ; FEP : céfépime ; ATM : aztréonam ; AMC : amoxicilline–acide clavulanique (AMC). *(Photographies : M. Auzou.)*



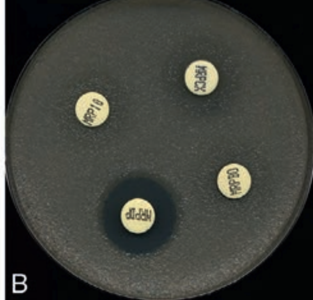


Fig 38.11 Recherche de carbapénémase avec disques contenant des inhibiteurs chez une souche de *Klebsiella pneumoniae* productrice de KPC-3 (A) ou de NDM-1 (B). MRP : méropénème ; MRPCX : méropénème + cloxacilline ; MRPBO : méropénème + acide boronique ; MRPDP : méropénème + acide dipocolinique [disques Rosco Diagnostics®]. *(Photographies : M. Auzou.)*

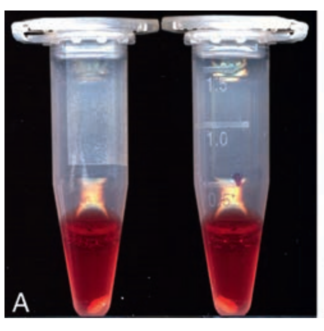
à la clindamycine, le caractère inductible de cette résistance doit être recherché par la mise en évidence d'un antagonisme entre ces deux molécules (D-test®). La recherche de sensibilité diminuée aux glycopeptides chez *Staphylococcus aureus* doit également être effectuée pour mettre en évidence les souches dites « hétéro-VISA », et différents tests utilisant un fort inoculum bactérien (McFarland 2) sont recommandés par le CA-SFM/EUCAST : test de dépistage sur MH + 5 mg/l de téicoplanine ; Macro-Etest® sur milieu cœur-cervelle.

Étude des associations d'antibiotiques

Buts d'une association

Il est possible voire nécessaire d'associer des antibiotiques pour différentes raisons :

- **élargissement du spectre :** il est souhaitable parfois d'élargir le spectre antibactérien aussi bien pour les infections communautaires que pour les infections nosocomiales. Par exemple, devant une pneumopathie grave, il est parfois difficile de déterminer l'étiologie de la maladie sur la seule clinique et une double antibiothérapie



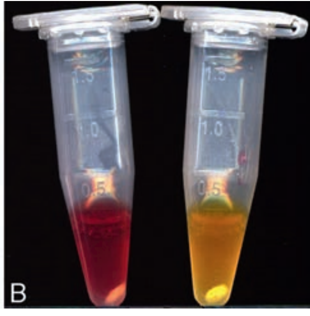


Fig 38.12 Recherche de carbapénémase chez les entérobactéries à l'aide du Carba NP test® : négative (A) et positive (B). Le virage de l'indicateur coloré au jaune est le témoin de l'hydrolyse du carbapénème. *(Photographies : M. Auzou.)*

probabiliste est parfois prescrite pour traiter aussi bien les bactéries telles que le pneumocoque ou *Haemophilus influenzae* que des bactéries intracellulaires comme *Chlamydophila* ou *Mycoplasma pneumoniae*;

- **prévention de l'émergence de mutants résistants :** il est admis que la probabilité d'obtenir un mutant résistant à deux antibiotiques est le produit des probabilités d'émergence de mutants résistants pour chaque antibiotique (environ 10^6). Un double mutant de résistance (10^{12} à 10^{14}) est donc assez rare, car les densités microbiennes, au site de l'infection, atteignent rarement cette densité. Certains antibiotiques, comme la rifampicine, l'acide fucidique et la fosfomycine, sont connus pour leur fréquence de mutation élevée et ne doivent pas être utilisés en monothérapie;
- **obtention d'une synergie :** la synergie entre deux antibiotiques correspond à une meilleure activité de l'association antibiotique par rapport à chacune des deux molécules prises isolément. La seule synergie démontrée in vitro et in vivo est l'association β-lactamines et aminosides. Le bénéfice des associations d'antibiotiques a été démontré dans certaines infections sévères telles que les endocardites, les bactériémies et les infections osseuses.

Effets des associations

Lors de tests in vitro étudiant l'association d'antibiotiques, quatre effets sont distingués :

- indifférence : l'activité de l'association n'est ni supérieure ni inférieure à celle de chacun des deux antibiotiques pris isolément;
- addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque antibiotique pris isolément;
- synergie : l'effet est supérieur à la somme des effets de chaque antibiotique pris isolément;
- antagonisme : l'activité est inférieure à la somme des effets des deux antibiotiques.

Techniques d'étude

Dilution en milieu liquide : méthode de l'échiquier

La méthode est identique à la détermination des CMI en milieu liquide, mais les concentrations d'antibiotiques sont associées entre elles deux à deux selon un schéma carré en microplaques (Fig. 38.13 et 38.14); la technique est dite de l'échiquier.

Après 16 à 24 heures d'incubation à environ 35 °C, la valeur de l'association est mesurée grâce au FIC index (*fractional inhibitory concentration*) dans les tubes où il n'y a pas de culture visible.

$$\text{FIC index} = \frac{CMI_{A/B}}{CMI_A} + \frac{CMI_{B/A}}{CMI_B}$$

$CMI_{A/B}$: CMI de l'antibiotique A en présence de l'antibiotique B.

$CMI_{B/A}$: CMI de l'antibiotique B en présence de l'antibiotique A.

La synergie est définie par un FIC index ≤ 0,5.

L'antagonisme est défini par un FIC index > 2.

Entre 0,5 et 1, il y a addition, et entre 1 et 2, indifférence.

Dans tous les tubes où il n'y a pas de culture visible, il est possible de pratiquer un repiquage sur gélose à l'aide d'une anse calibrée et de dénombrer les colonies. On compare ensuite cette numération à celle de l'inoculum de départ faite le premier jour (comme pour la détermination de la CMB). Il est possible de calculer alors un FBC index (*fractional bactericidal concentration*).

$$\text{FBC index} = \frac{CMB_{A/B}}{CMB_A} + \frac{CMB_{B/A}}{CMB_B}$$

Cependant, le caractère parfois non continu de l'effet bactéricide (phénomène de palier ou de rebond) rend difficile l'interprétation du FBC index. Il est plus adapté de comparer le nombre de survivants de l'association par rapport à celui obtenu pour l'antibiotique le plus actif pris isolément.

Techniques en milieu solide

Dilution en milieu solide

On peut utiliser la même technique qu'en milieu liquide mais en utilisant des boîtes gélosées contenant l'association d'antibiotiques à différentes concentrations. Dans ce cas, il sera possible de n'étudier que la bactériostase et pas la bactéricidie.

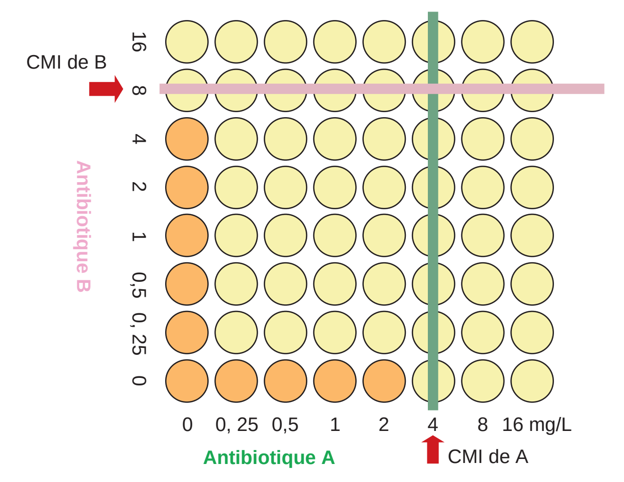


Fig. 38.13 Étude des associations d'antibiotique : technique de l'échiquier.

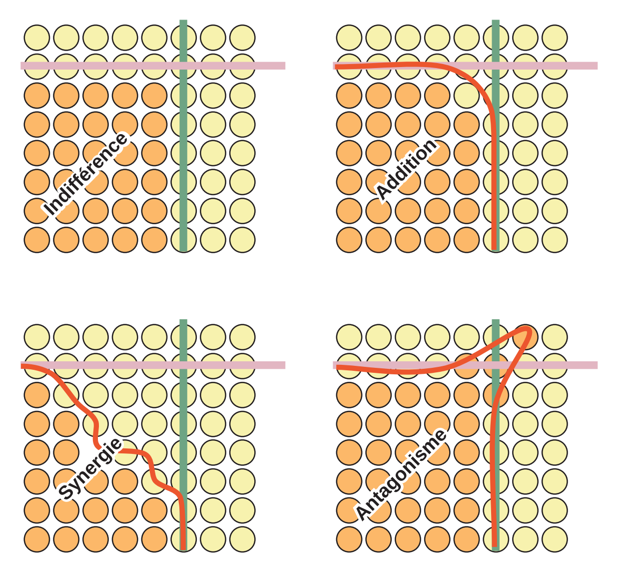


Fig. 38.14 **Étude des associations d'antibiotique.**

Diffusion en gélose

Il est possible d'utiliser les disques destinés à la réalisation des antibiogrammes ou des bandes de papier imprégnées d'antibiotiques disposés à angle droit ; l'antibiotique diffuse à partir de chaque bande selon un gradient exponentiel de concentrations décroissantes.

Après 16 à 24 heures d'incubation à environ 35 °C, on observe des images permettant de prédire l'effet de l'association en examinant avec attention la zone où les deux produits ont codiffusé.

Méthode des bandelettes

L'association de deux antibiotiques peut aussi être étudiée à l'aide des bandelettes type E-test®.

Une première bandelette correspondant à un antibiotique est déposée à la surface de la gélose ensemencée avec la bactérie à étudier. Après 1 heure de contact à environ 35 °C, la première bandelette est retirée et la deuxième est déposée sur l'empreinte de la première en prenant soin de faire coïncider les deux concentrations maximales de chaque bandelette.

Les associations doivent être réalisées dans les deux sens, tout d'abord la bandelette A puis la B, et sur une autre boîte la bandelette B puis la A. En parallèle, les CMI de A et B doivent être déterminées isolément.

Après 16 à 24 heures d'incubation à environ 35 °C, la CMI de l'association est comparée à la CMI de chaque antibiotique pris isolément.

Techniques génotypiques de détection de la résistance

Les techniques de biologie moléculaire ont été largement appliquées à la détection de la résistance aux antibiotiques. Cependant, seul un petit nombre d'entre elles sont utilisées à ce jour en routine dans les laboratoires de microbiologie, soit parce qu'elles sont encore trop onéreuses, soit parce qu'elles sont encore trop complexes à mettre en œuvre ou à interpréter. En effet, pour certaines familles d'antibiotiques et certains mécanismes de résistance, de très nombreux gènes existent, complexifiant la possibilité de les détecter de façon exhaustive.

Ces méthodes génotypiques viennent donc dans la majorité des cas compléter les méthodes phénotypiques. Malgré tout, elles présentent un intérêt dans les circonstances suivantes : bactéries à croissance lente ou difficilement cultivables (par exemple *Helicobacter pylori*, mycobactéries, intracellulaires), détection directe sur produits pathologiques permettant d'obtenir une réponse plus rapide (par exemple gène *mecA*), faible niveau d'expression de la résistance. En revanche, quelques limites sont à souligner avec les technologies actuelles qui sont pour la plupart fondées sur la PCR : seuls les gènes connus sont détectables ; certains phénotypes de résistance sont dus à des mécanismes moléculaires multiples et complexes (par exemple daptomycine, colistine) ; résistance liée au niveau d'expression d'un gène (par exemple hyperproduction de céphalosporinase chromosomique) ; aucun renseignement sur la sensibilité.

Différents industriels ont développé des kits ciblant spécifiquement quelques gènes de résistance chez certaines espèces bactériennes : résistance aux β-lactamines chez les staphylocoques (gène *mecA*), résistance aux glycopeptides chez les entérocoques (gènes *vanA* et *vanB*), résistance à la rifampicine chez *Mycobacterium tuberculosis* (mutations dans le gène *rpoB*), résistance aux C3G (CTX-M) et aux carbapénèmes (KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48) chez les entérobactéries. Ces kits reposent le plus souvent sur des techniques de PCR en temps réel dont certaines ont été développées sur des systèmes automatisés ne nécessitant pas de personnel qualifié en biologie moléculaire (par exemple GeneXpert®, Cepheid). Des systèmes de puces sont commercialisés pour détecter de nombreux gènes de β-lactamases (par exemple Check-Points®).

Même si la place du séquençage entier génomique (*whole genome sequencing* [WGS]) est encore limitée en routine (car long et coûteux), cette technologie permet d'identifier assez facilement de nouveaux gènes de résistance.

Dosage des antibiotiques

Pour qu'une antibiothérapie soit efficace, il faut que la concentration en antibiotique au site de l'infection soit suffisante et efficace, et ce d'autant plus dans les infections sévères où la concentration en antibiotique in situ doit être supérieure à la CMI.

Par ailleurs, il est aussi nécessaire d'être vigilant vis-à-vis du risque de toxicité des antibiotiques en dosant les antibiotiques au niveau sérique afin d'adapter la posologie. Le dosage des antibiotiques peut être réalisé dans les circonstances suivantes : insuffisance rénale ou dialyse, index thérapeutique faible (par exemple aminosides, glycopeptides), infections sévères, atteinte hépatique sévère, patients de réanimation, échec clinique, etc.

Ces aspects sont développés dans un chapitre spécifique (chapitre 39).

Les dosages d'antibiotiques seront généralement réalisés dans les laboratoires de pharmacologie. Dans ce cas, il est nécessaire de développer une synergie triangulaire entre bactériologiste, clinicien et pharmacologue.

Rôle du biologiste dans la prestation de conseils en antibiothérapie

Le conseil en antibiothérapie reste en premier lieu du ressort de l'infectiologue ; néanmoins, en tant que membre de l'équipe médicale, le microbiologiste doit être capable d'apporter son rôle de conseils. Cette fonction est d'ailleurs précisée dans la norme ISO15189. L'extrait du SH GTA 01 paragraphe 4.7, indique en effet que, « pour répondre à l'exigence de prestations de conseils, les biologistes médicaux peuvent par exemple rencontrer à périodicité définie les médecins demandeurs ou communiquer auprès d'eux quant aux modalités liées à leurs demandes (conseil sur le type et la nature des examens, communication téléphonique, circulaires d'information, site Internet, participation aux réunions multidisciplinaires, …). » Afin de répondre à cette prestation de conseils, il est souhaitable que le microbiologiste ait complété sa formation par un diplôme universitaire (DU) en antibiothérapie et par des remises à niveau régulière (« maintien des compétences »).

Rôle du biologiste dans la surveillance de l'épidémiologie de la résistance

L'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques évolue très régulièrement, faisant à juste titre dire que les bactéries d'aujourd'hui, en termes de résistance, ne sont pas les bactéries d'il y a seulement une dizaine d'années. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques, qui concerne surtout les bactéries à Gram négatif, est un problème mondial de santé publique, considéré aujourd'hui comme une menace par l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

Le biologiste a donc un rôle de surveillance de l'épidémiologie de la résistance, tant au niveau local que national. Au niveau local, il a pour obligation de recenser les bactéries multirésistantes isolées au sein de son laboratoire et d'informer les médecins prescripteurs. Il est de plus recommandé d'envoyer dans les Centres nationaux de référence (CNR) certains phénotypes de résistance aux antibiotiques, notamment les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV), les entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) ou encore les ABRI (*Acinetobacter baumannii* résistants à l'imipénem). La rétrocession de cette épidémiologie de la résistance, qui peut être très diverse d'un service de soins à un autre ou encore d'un établissement de soins à un autre, doit être réalisée idéalement une fois par an, afin d'orienter au mieux les choix de prescription antibiotique au niveau d'une institution. Cette rétrocession d'information peut ainsi conduire à un choix d'antibiothérapie probabiliste plus ciblée ou encore à la restriction d'utilisation de certains antibiotiques.

Au niveau régional, national, voire européen, le biologiste peut être sollicité pour faire remonter les résultats de l'épidémiologie de la résistance constatés au sein de son laboratoire, ce qui permet d'avoir une image assez exhaustive de l'épidémiologie de la résistance au niveau d'une interrégion ou d'un pays. Plusieurs réseaux existent au niveau interrégional, national et européen. En France, l'ONERBA qui regroupe plusieurs de ces réseaux, transmet les données de l'épidémiologie de la résistance au niveau européen à l'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC).

Pour en savoir plus

Communiqué 2015 (version 2.0) du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Site internet : www sfm-microbiologie.org.

Courvalin P, Goldstein F, Philippon A, et al. L'antibiogramme. Bruxelles : MPC/VIGOT ; 1985.

Courvalin P, Leclercq R. Antibiogramme. 3e éd. Paris : ESKA ; 2012.

Jauréguy F, Wilff M, Montravers P, et al. La Commission des anti-infectieux de l'Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Recommandations de bon usage des glycopeptides et lipoglycopeptides. J Anti-Infectieux 2012 ; 14 : 11–9.

Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods : dilution and disk diffusion methods. In : Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington, DC : ASM Press ; 2015.

Karlowsky JA, Richter SS. Antimicrobial susceptibility testing systems. In : Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington, DC : ASM Press ; 2015.

Leclercq R. Antibiogramme automatisé et expertise : concept et application. Rev Franc des Lab 1999 ; 312 : 115–7.

Limbago BM, Swenson JM. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In : Manual of Clinical Microbiology. 11th ed Washington, DC : ASM Press ; 2015.

Marcel JP. L'antibiogramme et son impact médical. Antibiotiques 2005 ; 7 : 53–8.

Osei Sekyere J, Govinden U, Essack SY. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. J Appl Microbiol 2015 ; 119 : 1219–33.

Société Française de Microbiologie (SFM). Référentiel en microbiologie médicale (Rémic). 5e éd. Paris : Société française de microbiologie ; 2015.

Chapitre 39

Dosage des antibiotiques : pourquoi, comment ?

F. Jehl

PLAN DU CHAPITRE

Pourquoi

Généralités

Les antibiotiques représentent une des rares classes thérapeutiques dont le récepteur est un organisme vivant. De ce fait, la sensibilité de la cible (la bactérie) au médicament (l'antibiotique) est variable, d'abord ponctuellement selon le couple antibiotique–bactérie, mais aussi dans le temps. En pratique, dans la majorité des cas, cette sensibilité peut être mesurée (CMI, CMB), et l'on dispose ainsi d'un objectif d'efficacité pour les concentrations d'antibiotiques in vivo. Bien que les conditions d'activité des antibiotiques in vitro soient certainement différentes de celles existant in vivo, cela autorise un raisonnement thérapeutique et justifie le dosage des antibiotiques en routine hospitalière quotidienne.

Ainsi, le dosage des antibiotiques est justifié dans au moins deux situations majeures :

- lors des études pharmacocinétiques descriptives et pharmacodynamiques nécessaires à la documentation des dossiers d'autorisation de mise sur le marché (AMM ; avec dosages sériques et tissulaires) ;
- pour le suivi thérapeutique au laboratoire de bactériologie des traitements des maladies infectieuses bactériennes (dosages quasi exclusivement sériques, rares LCR ou liquides pleuraux).

Suivi thérapeutique des antibiotiques

Ce suivi est justifié pour trois raisons :

- optimisation de la tolérance aux antibiotiques : les risques néphrotoxiques, hépatotoxiques, cardiotoxiques, neurotoxiques sont parmi les plus fréquents. Cette crainte explique pourquoi le dosage des molécules potentiellement toxiques (aminosides, glycopeptides) est réalisé depuis longtemps et fait partie des réflexes des cliniciens ;
- optimisation du traitement des infections bactériennes : les sous-dosages sont très fréquents, avec comme conséquence directe les échecs thérapeutiques. Le sous-dosage peut être considéré comme un vrai risque (de plus en plus fréquemment évoqué dans les conflits médicolégaux) ;
- prévention de l'émergence de résistances. On maîtrise de mieux en mieux les mécanismes de sélection des mutants résistants in vitro mais aussi in vivo, et les sous-dosages apparaissent en première ligne.

L'optimisation de traitement et la prévention de l'émergence de résistance n'ont pris leur réelle signification que grâce aux développements constants de la pharmacodynamie des antibiotiques (PK/PD, *pharmacokinetics/pharmacodynamics* des Anglo-Saxons). Celle-ci a permis de donner un cadre rationnel au suivi thérapeutique des antibiotiques, avec des objectifs clairs de taux sériques à atteindre, aussi bien en termes de résiduelles que de pics, selon la nature des molécules et de leurs modalités de bactéricidie dynamique.

Apport de la PK/PD au suivi thérapeutique des antibiotiques

Aminosides

Pharmacodynamie des aminosides

Bactéricidie

Les aminosides sont des antibiotiques caractérisés par une cinétique de bactéricidie très nettement concentration-dépendante ; la vitesse et la profondeur de leur bactéricidie sont directement proportionnelles à la concentration d'antibiotique mise en contact de la bactérie (fig. 39.1) [1]. Toute augmentation de la concentration est suivie d'une augmentation de la bactéricidie. Cependant, le principe de la bactéricidie globale d'un antibiotique ne résulte pas uniquement de sa capacité de tuer, c'est-à-dire de réduire considérablement l'inoculum, mais aussi de prévenir l'émergence de mutants résistants pendant l'intervalle entre deux « apports » d'antibiotique (in vitro ou in vivo). Dans toute population bactérienne, il existe spontanément des mutants

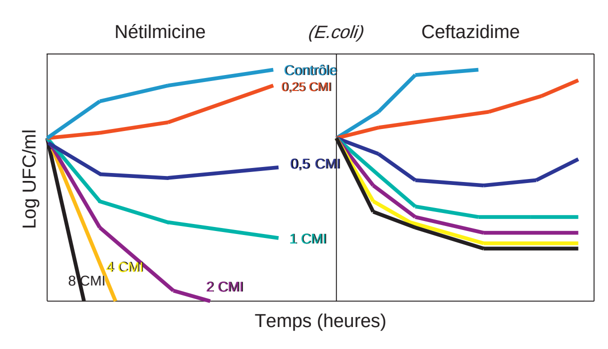


Fig. 39.1 Bactéricidie dynamique temps-dépendante d'une β-lactamine (ceftazidime) sur *E. coli* (à droite) par comparaison à la bactéricidie concentration-dépendante d'un aminoside (nétilmicine, à gauche). Log UFC/ml = nombre de bactéries/ml. L'augmentation des concentrations (exprimées dans le cas de la figure en multiples de CMI) d'un aminoside sur la souche d'*E. coli* étudiée se traduit par une augmentation de la vitesse de bactéricidie *et* de la profondeur de bactéricidie, proportionnellement à la concentration d'antibiotique. Cette modalité de bactéricidie est qualifiée de concentration-dépendante. Elle a induit des ajustements importants sur les modalités d'utilisation des aminosides. À l'inverse, l'augmentation des concentrations d'une β-lactamine, la ceftazidime, n'améliore la profondeur de bactéricidie qu'à concurrence d'une concentration égale à environ une fois la CMI. Au-delà de cette valeur, l'amélioration de la profondeur de bactéricidie n'est proportionnelle qu'au temps écoulé au contact de l'antibiotique à une valeur au moins égale une fois la CMI. Ce comportement a été qualifié de temps-dépendant.

résistants préexistants, pour peu qu'elle soit suffisamment dense, c'est-à-dire supérieure à la fréquence de mutation de l'antibiotique considéré. Pour les aminosides, a priori concentrations-dépendants, de fortes concentrations initiales en contact avec la bactérie, même pendant un laps de temps relativement court, permettent, en principe, couplées à l'effet postantibiotique (EPA, voir infra), de prévenir cette émergence avant l'apport suivant (entre deux intervalles) [2]. Mais dans l'hypothèse où le laps de temps entre la fin de l'EPA et le nouvel apport correspond à plusieurs temps de génération de la bactérie spontanément mutante, non tuée pendant la première phase, la population bactérienne est susceptible de recroître, limitant ainsi la bactéricidie dans son ensemble [2]. On voit ici l'importance de la *concentration maximale initiale* sur la bactéricidie des mutants, mais aussi l'importance capitale de la durée de l'EPA pour éviter la recroissance [2, 3].

Effet postantibiotique (EPA)

L'EPA peut être défini comme une rémanence de l'effet bactéricide de l'antibiotique même lorsque celui-ci n'est plus présent. L'existence de cet EPA a été démontrée aussi bien in vitro qu'in vivo [4].

D'une façon générale, l'EPA in vitro des aminosides varie entre 1 heure et plusieurs heures en fonction de la bactérie : 1 à 2 heures pour *S. aureus*, 2 à 8 heures pour les bacilles à Gram négatif. Son homologue in vivo est plus conséquent. En fait, la durée de l'EPA in vitro est proportionnelle à deux paramètres : la concentration de l'antibiotique pendant la période de contact et la durée de ce contact. Plus la concentration est élevée, et plus elle est élevée longtemps, plus l'EPA est important. C'est également vrai in vivo. On voit que tout schéma d'administration favorisant ces deux paramètres est à privilégier (dose unique journalière [DUJ]). La concentration élevée assure une bactéricidie optimale en diminuant l'inoculum, et de ce fait le risque d'émergence de mutants résistants, en favorisant l'EPA, qui prévient également des recroissances secondaires. La durée de l'EPA est donc très importante.

Résistance adaptative

Il s'agit de l'apparition d'une résistance phénotypique des bactéries ayant survécu à ce premier contact [5]. Leur CMI peut augmenter considérablement, et ce pendant un laps de temps parfois assez long, de l'ordre de quelques heures à 24 à 36 heures. Cette augmentation de CMI s'accompagne d'une diminution de la vitesse de bactéricidie, ainsi que d'une diminution de l'EPA. Cette résistance adaptative dure tant qu'il y a de l'antibiotique dans le milieu. Le retour à la sensibilité normale de la bactérie est d'autant plus long que l'on multiplie ses contacts avec l'antibiotique pendant la phase de résistance adaptative. Cela plaide clairement en faveur d'un espacement des doses, afin de permettre à la bactérie de retrouver sa sensibilité normale.

Paramètres pharmacodynamiques clés des aminosides

Les caractéristiques de la bactéricidie dynamique des aminosides ont fait émerger deux paramètres clés comme étant prédictifs à la fois de leur efficacité bactérioclinique et de leur capacité de prévenir l'émergence de mutants résistants [1–6] : le quotient inhibiteur maximal sérique (QI max = Cmax/CMI), et le rapport aire sous courbe des concentrations sériques par la CMI (ASC 24 heures/CMI). La CMI est celle relative à la bactérie responsable de l'infection. Si, pour ce second paramètre, la valeur cible à atteindre n'est pas encore très clairement définie mais de l'ordre de 250 selon les auteurs et les situations, il existe un consensus sur la valeur du rapport Cmax/CMI qui doit être compris entre 8 et 10 fois la CMI (de nombreuses revues sont consacrées à ce sujet, parmi lesquelles [6]). On saisit aisément l'importance de la valeur prise par le Cmax. Lorsque la documentation bactériologique n'est pas disponible, il est prudent de postuler que la CMI se situe à la valeur maximale qu'elle puisse prendre dans la catégorisation sensible, c'est-à-dire la concentration critique inférieure telle qu'elle est définie par le CA-SFM. Ces valeurs figurent dans le tableau 39.1, où apparaissent également les objectifs à atteindre. Les CMI peuvent ainsi imposer des pics sériques de l'ordre de 40 à 80 mg/l selon l'aminoside et la bactérie. Il est primordial d'obtenir de telles valeurs dès la première injection, pour

Tableau 39.1 **Valeurs requises pour T > CMI à une activité bactéricide pour différents couples antibiotiques–bactéries.**

Couple antibiotique/bactéries	T > CMI requis pour une activité bactéricide
C3G/entérobactéries	70
C3G/*Staphylococcus aureus*	40
C3G/pneumocoques	40
Amoxicilline/pneumocoques	50

éradiquer dès le départ les mutants résistants préexistants, s'assurer d'un EPA maximal et s'affranchir de la résistance adaptative. Certains travaux [6] ont clairement montré l'incidence d'un pic d'amikacine élevé d'emblée, supérieur à 40 mg/l, sur la survie de patients de réanimation. Dès lors, toute situation qui ne permettrait pas d'atteindre immédiatement de telles valeurs serait une situation à risque. On retrouve ainsi les patients ayant un volume de distribution significativement supérieur à la moyenne, ou chez qui la demi-vie d'élimination serait considérablement raccourcie. Ces situations sont potentiellement rencontrées chez les patients âgés, pédiatriques, de réanimation, les brûlés, les patients neutropéniques, qui sont autant de justification au dosage du pic des aminosides.

Conséquences : la monodose journalière

Il convient de privilégier les modes d'administration qui, d'une part, optimisent les paramètres pharmacodynamiques favorables à l'activité bactéricide et, d'autre part, minimisent ceux qui l'entravent. L'objectif étant d'obtenir des pics sériques les plus élevés possibles, ce qui répond à la bactéricidie concentration-dépendante et favorise l'EPA, il semble logique, au moins sur le plan théorique, d'administrer la dose totale journalière en une seule fois. Par ailleurs, administrer la dose suivante suffisamment loin de la précédente minimise l'impact de la résistance adaptative.

Suivi thérapeutique des aminosides

- Dosage au pic sérique, si possible dès la première administration : évaluation de l'efficacité
- Dosage en résiduelle : dans les situations à risque (insuffisance rénale, coadministration de substances néphrotoxiques, etc.), au-delà de 5 jours de traitement.

β-lactamines

Objectifs à atteindre

Les β-lactamines sont des antibiotiques temps-dépendants. Le paramètre prédictif de l'efficacité bactérioclinique est le temps pendant lequel les concentrations sériques sont supérieures à la CMI (fig. 39.2). Selon le couple antibiotique–bactérie, il doit atteindre des valeurs comprises entre 40 et 70 % pour garantir des conditions optimales de guérison bactérioclinique (tableau 39.2) [1]. Il n'est cependant pertinent que dans les infections modérées à peu sévères et semble peu utile dans un contexte de réanimation, où les infections sont plus sévères, sur des terrains souvent débilités. Dans les faits, des travaux de bactéricidie in vitro, des modèles PK/PD d'infection in vitro, surtout à *P. aeruginosa*, des modèles d'infections expérimentales (endocardites), ainsi que des études cliniques ont clairement montré que l'objectif à atteindre est une concentration de l'ordre de 4 à 10 fois la CMI [1, 8–16], et ce pendant un temps égal à 100 % de l'intervalle entre deux administrations. Donc l'objectif passe de T > CMI = 70 % à T > 4–10 CMI = 100 %. Cela signifie qu'à 100 % de l'intervalle (c'est-à-dire au moment de la valeur résiduelle), la concentration doit être égale à 4 à 10 CMI. Traduit en termes de quotients inhibiteurs (QI),

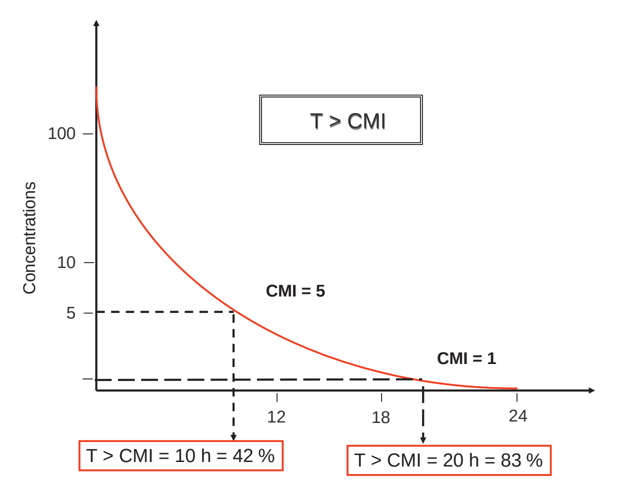


Fig. 39.2 T > CMI : il s'agit du temps pendant lequel les concentrations sériques sont supérieures à la CMI de l'antibiotique. Dans le cas présent d'une administration intraveineuse directe et d'une CMI égale à 5, les concentrations sont supérieures à cette valeur pendant 10 heures, soit 42 % de l'intervalle entre deux administrations. Si la CMI est égale à 2, le T > CMI augmente naturellement à 83 %.

Tableau 39.2 Différents quotients inhibiteurs utilisables – par exemple le pic sérique divisé par la CMI donne le quotient inhibiteur sérique maximal, QI max sér.

Concentration	Divisée par	QI résultant
Pic sérique	CMI	QI max sér
Résiduelle sérique		QI min sér
Pic tissulaire		QI max tis
Résiduelle tissulaire		QI min tis

cela est équivalent à un QI résiduel sérique compris entre 4 et 10, généralement 8.

Comment atteindre ces objectifs ?

Voie intraveineuse directe

À l'exception de la ceftriaxone, la plupart des β-lactamines ont une demi-vie courte, de l'ordre de 1 à 2 heures. Le tableau 39.3 donne les valeurs des concentrations résiduelles obtenues aux posologies usuelles des céphalosporines de troisième génération. À la posologie de 3 × 1 g ou 2 × 2 g (céfotaxime, ceftazidime, céfépime, aztréonam, etc.), les concentrations résiduelles obtenues ne « couvrent » pas les CMI supérieures à 0,1 mg/l en regard du pré-requis d'un QI au moins égal à 8. Une augmentation de la dose unitaire (3 × 2 g) n'améliore guère le résultat. Au-delà de CMI de 0,5 mg/l, l'administration en 2 ou 3 fois devient illusoire. Les objectifs PK/PD (8 CMI) sont trop élevés.

De ce fait, la perfusion continue est, en théorie, la voie optimale. La dose perfusée doit être adaptée à l'objectif 8 CMI. Cela représente le seul moyen d'avoir des concentrations en « résiduelles » (en fait en plateau) suffisamment élevées, puisqu'elles gardent théoriquement la même valeur pendant toute la durée de la perfusion (fig. 39.3) [15, 16].

Perfusion continue

L'objectif de la perfusion continue est d'atteindre un plateau de concentration de l'ordre de 8 CMI. Lorsque celle-ci est fournie par le laboratoire de bactériologie, la cible est aisée à calculer. Lorsque seul un antibiogramme de type S, I, R (sensible, intermédiaire, résistant) est disponible, il est judicieux de considérer que la CMI est égale à la concentration critique inférieure de l'antibiotique (concentration la plus élevée autorisant encore à classer la bactérie dans la catégorie « sensible »). Ces valeurs ont été récemment révisées et varient d'une molécule à l'autre. Une interprétation bactérioclinique documentée, éventuellement suivie d'une adaptation posologique imposent la mesure des CMI ponctuelles des bactéries isolées dans les situations critiques (tableau 39.4).

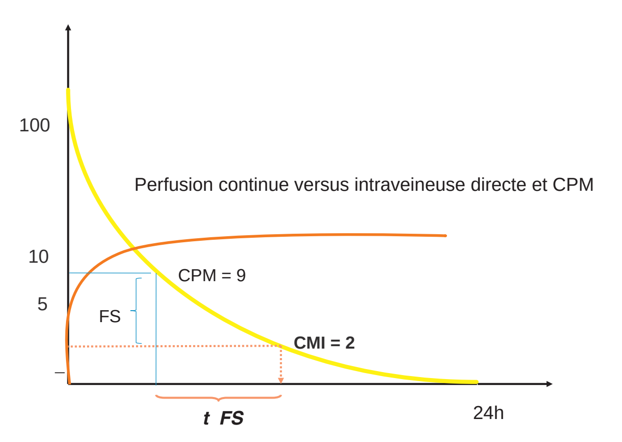


Fig. 39.3 Le plateau idéal à atteindre lors de l'utilisation de la perfusion continue est une concentration répondant à la fois au critère efficacité bactérioclinique (C = 8 × CMI) et au critère de prévention de l'émergence de résistance (C > CPM).

Quelle dose perfuser en 24 heures ?

La variabilité pharmacocinétique, aux origines multiples, chez les patients de réanimation fait qu'il est quasi impossible de prévoir d'emblée quelle sera la dose à perfuser pour atteindre un objectif fixé. Pour la ceftazidime, par exemple, on connaît une variabilité de 10 à 20 % chez le volontaire sain, de 30 à 40 % chez les malades de chirurgie et jusqu'à 50 à 70 % chez les patients de soins intensifs [17–19]. Les valeurs présentées dans le tableau 39.5 témoignent de cette variabilité importante. En conséquence, le dosage est impératif, bien entendu en résiduel lors d'administrations discontinues avec pour objectif 8 fois la CMI, mais aussi lors de l'utilisation de la perfusion continue. Cette voie d'administration ne dispense en aucun cas du suivi thérapeutique ; elle le simplifie cependant, la mesure au plateau pouvant se faire à n'importe quel moment de la perfusion continue.

Tableau 39.3 **Concentrations résiduelles usuelles des C3G, comparées aux pré-requis PK/PD. Au-delà d'une CMI = 0,5 mg/l, la voie discontinue (trois injections par jour) n'est plus adaptée.**

CMI	Concentrations cibles (8 × CMI)QI = 8	Concentrations résiduelles des C3G aux posologies usuelles	
		3 × 1 g	3 × 2 g
0,01	0,08	0,2–2,0	0,5–5
0,1	0,8		
0,5	4		
1	8		
4	32		

Tableau 39.4 **Concentrations critiques des β-lactamines (valeurs 2016)*.**

Antibiotiques	Bactéries	Concentration critique inférieure	Concentration critique supérieure
Céfotaxime, ceftriaxone	Entérobactéries	1	2
Ceftazidime, céfépime	Entérobactéries	1	2
Ceftazidime, céfépime	*P. aeruginosa*	8	8
Pipéracilline/tazobactam	Entérobactéries	8	16
Pipéracilline/tazobactam	*P. aeruginosa*	16	16
Imipénème, méropénème	Entérobactéries	2	8
Imipénème	*P. aeruginosa*	4	8
Méropénème	*P. aeruginosa*	2	8
Ertapénème	Entérobactéries	0,5	1
Aztréonam	Entérobactéries	1	4
Aztréonam	*P. aeruginosa*	1	16

* La concentration critique inférieure doit être utilisée dans le calcul de l'objectif à atteindre lors du suivi thérapeutique mené par le dosage des antibiotiques. Elle peut varier selon la bactérie pour un antibiotique donné.

Tableau 39.5 **Comparaison des valeurs résiduelles obtenues après administration fractionnée avec la valeur au plateau de la perfusion continue, et variabilité de ce plateau indépendamment de la posologie (d'après [19])*.**

	Doses perfusées sur 24 heures (g) (sauf [1])	Concentrations à l'équilibre (sauf [2])	Écarts
Ceftazidime	6 g	28,4	20–30
	3 g	29,7	10–62
	4 g	21	6–36
	3 × 2 g[1]	Cmin = 4,6[2]	
	3 g		11–30
	4 g		20–35
	6 g		28–44
Céfépime	4 g	28	18–39
	2 × 2 g[1]	Cmin = 3,3[2]	

* Cette variabilité impose le dosage au plateau lors de l'administration en perfusion continue.

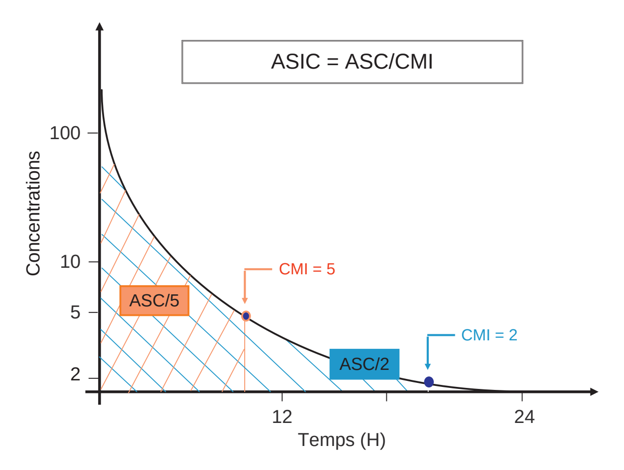


Fig. 39.4 ASIC : ASC/CMI. La surface sous courbe à considérer pour le calcul est celle obtenue par les concentrations *supérieures à la CMI*. Dans le cas présenté, il s'agit d'une seule administration par 24 heures. Le principe du calcul reste le même pour 2, 3, ou plus administrations par 24 heures.

β-lactamine et prévention de l'émergence de résistance

Paramètres impliqués

Le rapport ASC 24 heures/CMI (fig. 39.4) est prédictif de la capacité de la β-lactamine de prévenir l'émergence de résistance. Un pré-requis minimal de 250 semble nécessaire [17–22]. Par ailleurs, il est important que les concentrations sériques restent le moins longtemps possible dans la fenêtre de sélection, c'est-à-dire dans une fourchette de concentration comprise entre la CMI et la concentration de prévention des mutants résistants (CPM ; fig. 39.3 et 39.5).

CPM et perfusion continue

Le plateau idéal à atteindre lors de l'utilisation de la perfusion continue est une concentration répondant à la fois au critère d'efficacité bactérioclinique (C = 8 × CMI) et au critère de prévention de l'émergence de résistance (C > CPM) (fig. 39.3).

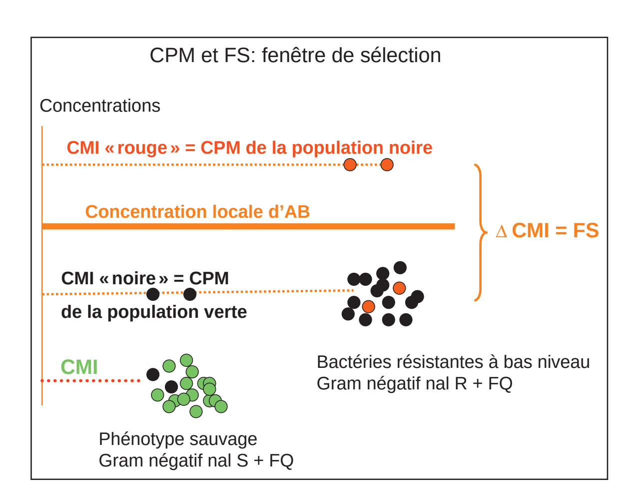


Fig. 39.5 Concentration de prévention des mutants résistants (CPM). La population bactérienne « verte », avec sa propre CMI « verte », possède des mutants résistants préexistants « noirs », avec leur propre CMI « noire », plus élevée. Si la population de départ, comme dans le cas présent, est très sensible, la CPM (CMI des noires) reste relativement basse. Si le niveau de « départ » se situe plus haut, comme c'est le cas de la population principale noire dans cet exemple, les mutants pré-existants auront donc des CMI rouges situées à un niveau plus élevées ; c'est la CPM de la population « noire ». FQ : fluroquinolone.

Il est impossible pour l'instant de déterminer la CPM en routine de façon aisée et rapide. Il s'avère cependant que, d'une façon générale, la CPM est de l'ordre de 5 à 10 fois la CMI.

Perfusion continue en routine et dosages

Dans l'utilisation au quotidien de la perfusion continue, deux points sont critiques :

- Quelle dose utiliser d'emblée ?
- Faut-il faire une dose de charge d'emblée avant la perfusion ?

La dose à perfuser est peu prévisible. Le tableau 39.5 confirme qu'une concentration cible donnée peut résulter de doses allant du simple au double. La variabilité est très grande. Les doses proposées dans la littérature oscillent entre 2 g et 6 g/24 heures, parfois plus. Le point essentiel est de doser le plateau obtenu 3 à 4 heures suivant le début de la première

perfusion et d'adapter en fonction du résultat et de l'objectif fixé (c'est-à-dire 8 CMI si elle est mesurée, 8 fois la concentration critique inférieure si le résultat est uniquement « S »). Notre expérience prouve que, dans la très grande majorité des cas, la première dose est trop faible; la deuxième dose est très souvent revue à la hausse. En conséquence, il peut paraître raisonnable de privilégier d'emblée une forte dose susceptible d'être plus efficace, quitte à la diminuer le cas échéant (situation rare). Le risque encouru semble mineur en regard du risque de sous-dosage pour des posologies trop faibles. Le point crucial reste le contrôle du taux sérique obtenu qui devient le déterminant majeur de l'adaptation posologique. Dans cette logique, il paraît inacceptable d'avoir une période de « latence » en début de perfusion nécessaire à l'antibiotique pour atteindre le plateau. La dose de charge semble donc incontournable.

Le suivi thérapeutique des β-lactamines dans les infections sévères, ou à BMR, ou en présence de CMI élevées, ou à *P. aeruginosa* (+ carbapénèmes, + ceftazidime, + pipéracilline-tazobactam, + aztréonam, etc.), ou hémodynamique perturbée, ou brûlés, ou polytraumatisés, ou mucoviscidose :

- dosage des résiduelles lors d'administration discontinues (même perfusion courte), ou dosage au plateau en perfusion continue de 24 heures
- objectif : 8 CMI, ou 8 fois concentrations critiques inférieures

Fluoroquinolones

Pharmacodynamie des fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont caractérisées par une bactéricidie de type concentration-dépendante. Les paramètres PK/PD pertinents sont le rapport ASC/CMI (aire sous courbe des concentrations sériques/CMI) et le QI max (Cmax sérique/CMI). Le premier est prédictif de l'efficacité bactérioclinique lorsqu'il atteint le pré-requis; le second est en relation avec la capacité de l'antibiotique de prévenir l'émergence de mutants résistants.

Les nombreux mécanismes de résistances jouent un rôle important dans la pharmacodynamie des fluoroquinolones. Pris isolément, ces mécanismes n'ont pas les mêmes répercussions sur la sensibilité des bactéries. Les mutations touchant les topoisomérases sont responsables des plus hauts niveaux de résistance (après deux mutations successives, sur le gène *gyr A* puis le gène *par C*). Les autres mécanismes (imperméabilité, pompes à efflux, protéine qnr, AAC6′) ont plutôt pour effet direct une résistance de bas niveau, mais ils facilitent l'apparition des résistances de haut niveau. Ils ont pour effet d'*augmenter la CPM* et donc d'augmenter le risque de sélection de résistance [23–26] (fig. 39.6). L'acquisition d'un mécanisme de résistance par imperméabilité (ou par efflux, ou par protéine qnr) peut parfois impliquer une résistance clinique dès la première mutation des topoisomérases (fig. 39.7 et 39.8). Ce sont donc des situations qui peuvent justifier de dosages destinés à vérifier les concentrations sériques.

Objectifs à atteindre en termes d'efficacité

L'efficacité des fluoroquinolones est liée à l'obtention d'un rapport ASC/CMI égale au moins à 30 pour les bactéries à

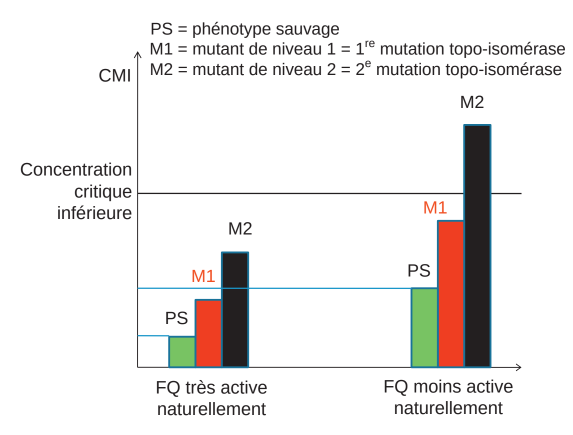


Fig. 39.6 Les mutations touchant les topoisomérases se succèdent et s'additionnent. Lorsque le niveau de départ est suffisamment « bas », les CMI restent inférieures à la concentration critique inférieure, même au terme de la deuxième mutation. Au contraire, si le niveau de départ est « trop haut » (quelle qu'en soit l'origine), la souche devient résistante au terme de la deuxième mutation. Ainsi, le niveau de la sensibilité de départ est un paramètre très important dans l'obtention des mutants de haut niveau. FQ : fluroquinolone.

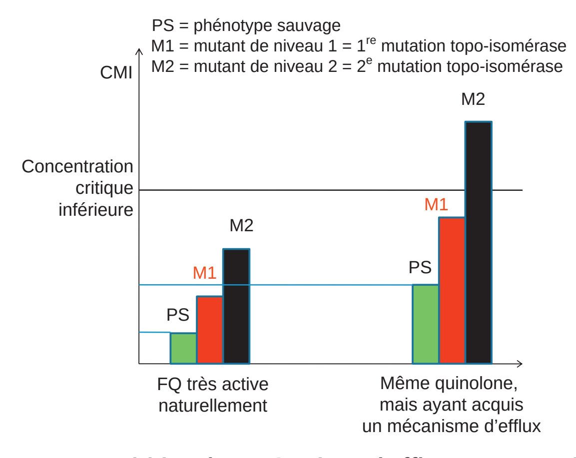


Fig. 39.7 L'acquisition d'un mécanisme d'efflux met une quinolone, même très active naturellement, dans une situation où l'acquisition d'une résistance de haut niveau est plus probable. Elle augmente la CPM. FQ : fluroquinolone.

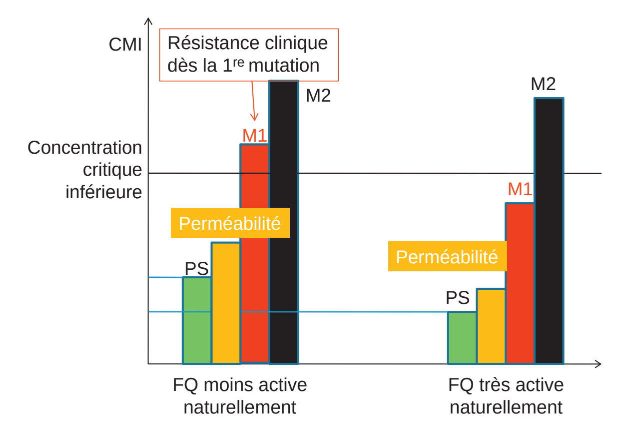


Fig. 39.8 L'acquisition d'un mécanisme de résistance par imperméabilité (ou par efflux, ou par protéine qnr) peut parfois impliquer une résistance clinique dès la première mutation des topoisomérases. FQ : fluroquinolone; PS : phénotyle sauvage.

Gram positif, en particulier pour le pneumocoque, et des valeurs de l'ordre de 125 à 250 pour les bactéries à Gram négatif. Cette constatation vaut particulièrement pour les infections respiratoires. L'obtention d'un rapport Cmax/CMI (QI max) > 10 est également prédictif de l'efficacité bactérioclinique vis-à-vis de *P. aeruginosa* [23–26].

Bactéries à Gram négatif [23–26]

Lorsqu'elles sont du phénotype sauvage, les entérobactéries ont très généralement des CMI très basses. Ces CMI (0,1 ou 0,01 mg/l), confrontées aux concentrations usuelles obtenues aux posologies usuelles des fluoroquinolones, permettent d'obtenir des paramètres PK/PD en accord avec les pré-requis à l'efficacité ou la prévention de l'émergence de résistance. Une résistance aux quinolones non fluorées (non sauvages) dans un contexte d'infection sévère impose la mesure de la CMI des fluoroquinolones et l'évaluation de l'ASIC en cours de traitement (par un dosage du pic et de la résiduelle qui permet d'approcher l'ASC et donc de calculer l'ASIC). Pour *P. aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii*, toujours dans un contexte d'infection sévère, la mesure de la CMI peut également s'imposer en raison d'une sensibilité naturelle souvent moyenne de ces espèces à ces antibiotiques.

Bactéries à Gram positif [23–26]

Si les staphylocoques ont généralement une sensibilité aux fluoroquinolones qui permet de satisfaire aux pré-requis PK/PD, il n'en est pas de même pour le pneumocoque et autres cocci à Gram positif en chaînettes. En effet, les CMI des nouvelles fluoroquinolones sont relativement élevées, quand bien même elles autorisent toujours leur catégorisation clinique en « sensible » en regard des concentrations critiques inférieures dans la grande majorité des cas. Le tableau 39.6 montre que l'écart est faible entre les CMI 90 des pneumocoques et les CMI maximales que les fluoroquinolones récentes peuvent prendre pour rester dans des valeurs acceptables de l'ASIC. Le moindre glissement vers des valeurs de CMI plus élevées mettrait les fluoroquinolones en porte à faux vis-à-vis du pneumocoque. La mesure des CMI semble donc également s'imposer dans les situations à risque, conjointement aux dosages des concentrations sériques.

Objectifs à atteindre en termes de prévention de l'émergence de résistance

L'objectif est un pic sérique amenant le QI max à 10 à 12. Les considérations relatives à l'ASIC s'appliquent aussi au QI max (CMI, concentrations sériques). Ainsi, les entérobactéries acide nalidixique-R, *P.aeruginosa* et *Acinetobacter* spp. et *S. pneumoniae* forment-ils des couples à risque avec une fluoroquinolone. Cela s'avère une fois de plus particulièrement vrai avec le pneumocoque (tableau 39.6), pour lequel les CMI 90 sont très proches des valeurs de CMI maximales au-delà desquelles le risque d'émergence de résistance est réel. La CPM n'est pas un paramètre mesurable en routine et est donc plus difficile à exploiter dans ce contexte. Néanmoins, il est intéressant de constater, chaque fois qu'elle a été explorée, qu'elle est sensiblement égale à une dizaine de fois la CMI, ce qui coïncide avec le pré-requis de 12 pour le QI max.

Tableau 39.6 **PK/PD des fluoroquinolones et pneumoques*.**

	Dose	ASC	CMI max tolérée pour ASIC = 30
Ciprofloxacine	750	16	0,53
Ofloxacine	400	28	0,90
Lévofloxacine	500	53	1,8
Lévofloxacine	750	90	3,0
Moxifloxacine	400	35	1,1
	Dose	**Cmax**	**CMI max tolérée pour QI = 12**
Ciprofloxacine	750	4,3	0,35
Ofloxacine	400	5,5	0,45
Lévofloxacine	500	7,8	0,65
Lévofloxacine	750	12,0	1,0
Moxifloxacine	400	3,1	0,25

* Les CMI maximales acceptables pour obtenir une ASIC en adéquation avec le pré-requis sont proches des CMI 90 pour la lévofloxacine et la moxifloxacine vis-à-vis du pneumocoque. Ces chiffres expliquent également pourquoi ciprofloxacine et ofloxacine sont inefficaces sur le pneumocoque. Les CMI maximales acceptables pour obtenir un QI en adéquation avec le pré-requis sont proches des CMI 90 de ces antibiotiques vis-à-vis du pneumocoque. Ces chiffres expliquent l'incapacité de la ciprofloxacine et de l'ofloxacine de prévenir l'émergence de résistance du pneumocoque. Ils montrent également que la situation pour lévofloxacine et moxifloxacine, si elle est acceptable, ne laisse aucune marge de CMI. Toute évolution vers des CMI augmentées emballerait un processus de résistance.

Le suivi thérapeutique des fluoroquinolones

- Inutile sur les entérobactéries de phénotypes sauvages (Nal S)
- Pics et résiduelles pour *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., entérobactéries Nal R et infections sévères, pneumopathies ou autres infections sévères à pneumocoques (particulièrement si résistance à haut niveau à la norfloxacine, c'est-à-dire contact au disque par diffusion). Calculer une aire sous courbe approchée (ASC = [pic + résiduelle]/2 × intervalle), et ASIC = ASC/CMI. Valeur cible : 30 (Gram +) et 250 (Gram –)
- Prévention de la résistance QI max : au pic, valeur cible ; 12 fois la CMI.

Pharmacodynamie des glycopeptides [27–31]

Les glycopeptides sont considérés de façon très consensuelle comme des antibiotiques dont les modalités d'activité bactéricide sont temps-dépendantes. Il existe un faisceau d'arguments obtenus aussi bien in vitro qu'in vivo, à travers de nombreux modèles d'infections expérimentales ou en clinique humaine :

- in vitro : travaux de bactéricidie dynamique ;
- in vivo : infections expérimentales telles que péritonites à staphylocoques ou pneumocoques, endocardites à *S. aureus*, infections à *S. aureus* chez la souris neutropénique, endocardite à entérocoques ;

- in vivo en clinique humaine, telles que septicémies à *S. aureus* traitées par la teicoplanine, avec un succès thérapeutique corrélé au Cmin et QI min, infections à *S. aureus* méti-R (teicoplanine) avec mise en évidence de l'importance du T > CMI et surtout du QI sérique résiduel, dont la valeur seuil a été établie à 8.

Objectifs à atteindre en termes d'efficacité et de prévention de la résistance

Comme pour les β-lactamines, l'efficacité bactérioclinique des glycopeptides est liée à l'obtention d'un quotient inhibiteur résiduel de l'ordre de 8 (QI rés = 8), ce qui correspond à un T > 8 CMI = 100 %. Elle est également corrélée à l'ASIC pour une valeur autour de 400. La prévention de l'émergence de résistance est aussi corrélée à l'ASIC.

Quotient inhibiteur résiduel

Pour des staphylocoques de phénotypes sauvages, ou ceux pour lesquels les CMI ne dépassent pas 1 mg/l, les posologies « usuelles » des glycopeptides (teicoplanine 400 mg/j, vancomycine 3 fois 500 mg) autorisent des quotients inhibiteurs en adéquation avec les pré-requis PK/PD des glycopeptides en termes d'efficacité. Ces pré-requis sont a fortiori atteints avec des posologies supérieures.

Certaines souches de staphylocoques, de plus en plus nombreuses, sont caractérisées par des CMI approchant 2 mg/l, limite actuelle de sensibilité. Pour ces CMI supérieures à 1 mg/l, les pré-requis du quotient inhibiteur ne sont plus atteints aux posologies « basses » des glycopeptides. Il faut alors recourir aux posologies « élevées », 800 mg (ou plus) pour la teicoplanine, et à la perfusion continue pour la vancomycine. Il est à noter que la dose à perfuser pour atteindre le pré-requis est imprévisible, à l'instar de ce que l'on observe pour les β-lactamines. Cela justifie le recours aux dosages au plateau pour vérifier l'obtention d'une concentration égale à au moins 8 fois la CMI. La dose de charge avant la perfusion continue semble incontournable.

ASIC

Comme pour le QI rés, les posologies « usuelles basses » des glycopeptides autorisent des ASIC en adéquation avec les pré-requis PK/PD en termes d'efficacité et de prévention de la résistance, lorsque les CMI ne dépassent pas 1 mg/l. Pour des CMI supérieures à 1 mg/l, il faut recourir aux posologies « élevées », et à la perfusion continue pour la vancomycine.

> **Suivi thérapeutique des glycopeptides**
>
> - Inutile sur les phénotypes sauvages
> - Dans les infections sévères, ou à staphylocoques à CMI élevées, ou hémodynamique perturbée, ou brûlés, ou polytraumatisés, ou mucoviscidose ; endocardites, infections ostéoarticulaires
> - Dosage des résiduelles lors d'administrations discontinues (même perfusion courte), ou dosage au plateau en perfusion continue de 24 heures
> - Objectif : 8 CMI, ou 8 fois concentrations critiques inférieures.

Importance de la mesure de la CMI

Quelle que soit la famille antibiotique considérée, on peut donc constater que la mesure de la CMI devient un élément incontournable dans l'interprétation des résultats des dosages [32–34]. La concentration critique inférieure peut être utilisée par défaut en absence de la CMI mesurée ponctuellement sur la souche supposée être responsable de l'infection. Elle intervient également comme facteur prédictif d'échec ou de succès thérapeutique [35, 36]. Parmi les méthodes de mesure de la CMI, il convient de privilégier les méthodes par microdilution en milieu liquide.

Comment

On identifie traditionnellement trois grands groupes de méthodes de dosages des antibiotiques :

- microbiologiques [37–39] ;
- immuno-enzymatiques [38] ;
- chromatographiques et électrophorétiques [40–42].

Dosages microbiologiques

Principe général

Ce sont les plus anciennement utilisés. Ils font appel à des méthodes qui dosent l'activité microbiologique globale du sérum contenant l'antibiotique. Les méthodes microbiologiques utilisent la comparaison des diamètres obtenus avec une gamme de concentrations connues de l'antibiotique vis-à-vis d'une bactérie sensible incluse dans une gélose, aux diamètres d'inhibition de l'échantillon à doser. La bactérie peut également être ensemencée à la surface de la gélose. Le liquide biologique à doser peut être placé dans un cylindre ou déposé sur un disque et diffuser dans la gélose. De nombreuses variations dans les conditions techniques de réalisation existent concernant surtout la nature de la souche indicatrice, les milieux de culture, les temps et température d'incubation. Lors des associations d'antibiotiques, il faut ajouter des inhibiteurs de l'antibiotique qu'on ne souhaite pas doser.

Utilité actuelle

Cette technique n'est plus utilisable en routine car, en raison des délais de réponse trop longs, elle ne répond pas aux impératifs de rapidité dont doit bénéficier un ajustement posologique. Elle peut encore présenter un intérêt lors d'études pharmacocinétiques de nouvelles molécules, dans la recherche d'éventuels métabolites actifs par comparaison avec des méthodes plus spécifiques comme les méthodes immunologiques et surtout chromatographiques. Elle peut être informative a posteriori dans l'explication de certains échecs thérapeutiques.

Dosages immunologiques

Principes de base

Le principe consiste à fixer un anticorps spécifique sur l'antigène d'intérêt (antibiotique à doser), puis à révéler la présence de cet anticorps, avec un second anticorps anti-anticorps accroché à un révélateur.

On distingue deux grands types de dosages immunologiques utilisant un marqueur, selon que le réactif, c'est-à-dire l'anticorps, est limitant ou en excès par rapport à l'antigène (antibiotique) à doser.

- *Méthode directe : dosage avec excès de réactif.* La totalité de l'antigène à doser se lie à l'anticorps fixe. Il est ensuite révélé par un anticorps marqué. On mesure la fraction liée qui augmente avec la concentration en antigène à doser. Le signal est croissant (fig. 39.9).
- *Méthode indirecte, avec réactif limitant.* L'antigène à doser entre en compétition avec l'antigène marqué pour la liaison à l'anticorps. La totalité des sites anticorps disponibles est liée. On mesure la fraction libre qui est inversement proportionnelle à la concentration en antibiotique. Le signal est décroissant (fig. 39.10).

Dans ces deux cas de méthodes par compétition, il faut employer un traceur (marqueur) qui caractérise l'antigène marqué; il peut s'agir d'une enzyme, d'une molécule radiomarquée, luminescente, fluorescente (tableau 39.7). L'utilisation d'enzymes est fréquente. Elles doivent être faciles à obtenir, et à purifier, stables, et mettre en jeu une réaction produisant un composé coloré (tableau 39.8). La mesure de la liaison du traceur lié à l'anticorps nécessite l'utilisation d'une méthode adéquate de séparation du traceur libre et lié. De nombreuses méthodes de séparation existent (précipitation par polyéthylène glycol, adsorption sur charbon actif, etc.).

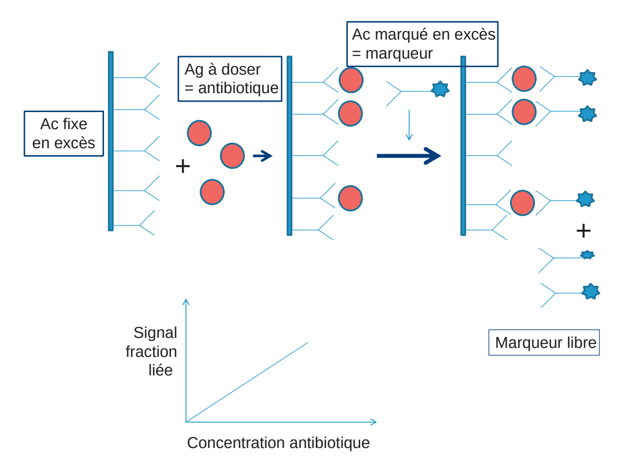


Fig. 39.9 Méthode directe, avec excès de réactif. La totalité de l'antigène à doser se lie à l'anticorps (Ac) fixe. Il est ensuite révélé par un anticorps marqué. On mesure la fraction liée qui augmente avec la concentration en antigène (Ag) à doser. Le signal est croissant.

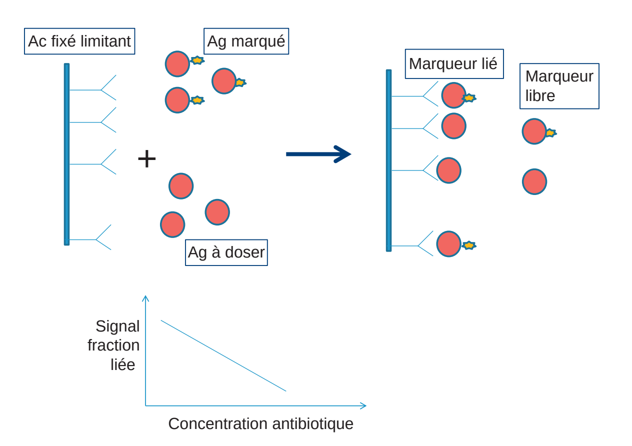


Fig. 39.10 Méthode indirecte, avec réactif limitant. L'antigène (Ag) à doser entre en compétition avec l'antigène marqué pour la liaison à l'anticorps (Ac). La totalité des sites anticorps disponibles est liée. On mesure la fraction libre qui est inversement proportionnelle à la concentration en antibiotique.

Tableau 39.7 **Classification des méthodes de dosages immunologiques.**

Traceur	Dosages avec compétition (anticorps limitant)	Dosages sans compétition (anticorps en excès)
Radiomarqué	*Radio-immunoassay* (RIA)	*Immunoradiometric assay* (IRMA)
Enzyme	*Enzymo-immunoassay* (EIA) *Enzyme multiplied immunoassay* (EMIT)	*Enzyme-labeled immunosorbent assay* (ELISA)
Fluorescent	*Fluoro-immunoassay* (FIA)	*Immunofluorometric assay* (IFMA)
Luminescent	*Lumino-immunoassay* (LIA)	*Immunoluminometric assay* (IFLA)

Appareils existants

Le tableau 39.9 recense les appareils existants et les types de dosages leur correspondant. La figure 39.11 montre un de ces appareils.

Avantages et inconvénients des méthodes immunologiques

Avantages

Indéniablement, le fait de pouvoir travailler sur du sérum sans traitement préalable est d'un grand confort et rend ces techniques très praticables. Le volume de sérum nécessaire est faible, et limite ainsi le volume de sang à prélever (pédiatrie). Ces techniques sont totalement automatisées, et ainsi à la portée de personnel sans formation préalable poussée. Enfin, elles sont parfaitement adaptées au suivi thérapeutique de routine puisque très rapides, le temps nécessaire s'échelonnant de 30 minutes à 2 heures selon le nombre et la diversité des dosages à réaliser. Elles répondent bien à la notion d'urgence qui accompagne parfois le dosage de certains antibiotiques, comme par les aminosides et les glycopeptides dans les situations à risque.

Inconvénients

Les automates sont fermés et n'autorisent aucun contrôle. Il n'y a aucun moyen de s'assurer du bon déroulement du dosage pour les échantillons des patients en ce qui concerne les interférences. La spécificité n'est pas toujours excellente. Le développement et la mise à disposition des kits sont parfois aléatoires, soumis aux aléas de la rentabilité pour le fabricant. Ces techniques sont coûteuses en réactifs.

En termes d'accréditation, l'expérience prouve que ces méthodes sont peu robustes. Le suivi des contrôles de qualité internes ainsi que la participation à une ou plusieurs évaluations externes de la qualité sont vivement recommandés. Les erreurs sont souvent aléatoires.

Tableau 39.8 **Enzymes utilisées en méthodes immuno-enzymatiques.**

Enzymes	Sources	Substrats	Produits
Lysozyme	Blanc d'œuf		
Malate déshydrogénase	Mitochondries cœur de porc		
Glucose-6P déshydrogénase		G6-phosphate	NADH ou NADPH, 340 nm
Peroxydase	Raifort	H2O2 + orthophénylène diamine H2O2 + Luminol	Produit coloré orange Produit luminescent
Glucose oxydase	*Aspergillus niger*		
Phosphatase alcaline	*E. coli*	4-nitrophényl-phosphate	4-nitrophénol jaune 405 nm
β-galactosidase	*E. coli*	ONPG	2-nitrophénol jaune 405 nm

Tableau 39.9 **Principaux appareils commercialisés.**

Technique	Fabricant	Appareil	Antibiotiques dosés
EMIT	Dade Behring	Cobas Mira®, ACA®	Gentamicine, tobramycine, nétilmicine, amikacine, vancomycine
FPIA	Abbott Roche	TDx® et AxSym® Cobas Integra®	Aminosides, glycopeptides
FIA	Dade Behring	Opus®	Vancomycine
Spectrophotométrie	Bayer	Immuno I®	Vancomycine
	Siemens	Viva E®	Aminosides, vancomycine
	Fischer Scientific	Indiko®, Indiko plus®	Aminosides, glycopeptides



Fig. 39.11 Automate d'immunodosage des aminosides et de la vancomycine. Sur le dessus de l'appareil, au centre, sont visibles les carrousels porteurs d'échantillons ainsi que les bras préleveurs. Sur la gauche, l'écran permet une visualisation de la localisation des différents échantillons sur le plateau.



Fig. 39.12 Deux systèmes de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) isocratique. On distingue deux pompes, de part et d'autre du recueil de l'effluent (éliminé). La vanne et la colonne apparaissent agrandies dans la figure 39.13. Les détecteurs sont sous les pompes. À gauche, l'informatique de pilotage des pompes et d'intégration des données. On peut constater que l'encombrement est mineur.

Dosages chromatographiques

La seule technique utilisée est la chromatographie liquide à haute performance (CLHP, fig. 39.12, tableau 39.10). Il s'agit avant tout d'une technique de chromatographie, donc de séparation des constituants d'un mélange. Cette séparation peut se faire aux fins de purification d'un constituant (chromatographie préparative) ou de détection/analyse/dosage (chromatographie analytique). La chromatographie en phase liquide est la plus utilisée. Cela signifie que les deux phases, stationnaire et mobile, non miscibles entre elles, entre lesquelles les constituants du mélange vont se partager de façon préférentielle selon leurs propriétés physicochimiques (et donc se séparer), sont «liquides». La notion de haute performance est apparue après l'appellation d'origine de chromatographie liquide à haute pression (eu égard aux pressions élevées dans les colonnes), lorsqu'il a semblé évident que cette technique autorisait de «hautes performances» analytiques.

Tableau 39.10 **Éléments classiques d'un système de CLHP pour le dosage des antibiotiques.**

Solvants d'élution	Type de chromatographie	Colonnes	Types de détecteurs
Tampon + solvant apolaire (organique) ou polaire dans le même flacon	Isocratique	Support polaire : chromatographie en phase normale (rare) Support apolaire : chromatographie en phase inverse, le plus fréquent Colonne d'échange d'ions (très rare)	Absorbtiométrie UV (Spectro) photomètres Fluorimétrie (Spectro) fluorimètre Électrochimie (rare) Spectrométrie de masse (rare en routine)
Tampon + solvant apolaire ou polaire dans deux flacons différents	Proportion constante des deux constituants : isocratique		
	Variation dans le temps (augmentation) du solvant apolaire : technique en gradient		

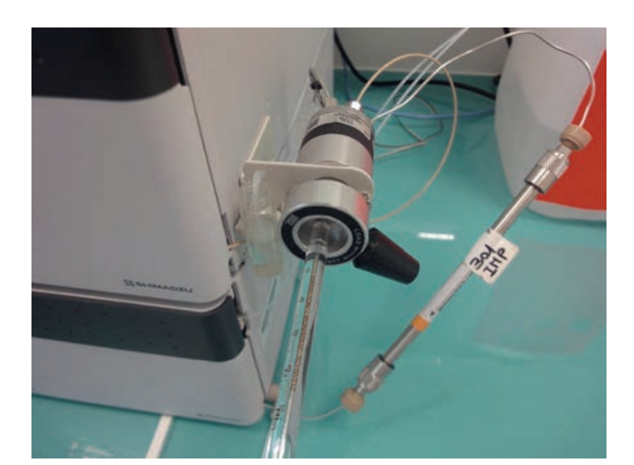


Fig. 39.13 Vanne d'injection et colonne de chromatographie. La seringue en verre sert à charger la vanne calibrée par une boucle d'injection de volume choisi fixe (à l'arrière de la vanne). Une fois chargée, il suffit d'injecter en tournant la manette noire. La colonne présentée mesure 15 cm. Il en existe de plus petites (jusqu'à 3,5 cm, souvent garnie de particules de silice très petites, de l'ordre de 2 à 3 µm) et de plus grandes (25 cm, taille des particules 5 µm). La colonne présentée sert au dosage de l'imipénème, très demandé par les réanimateurs, et d'autres β-lactamines nécessitant les mêmes solvants. Point important : les fixations des tubulures aux colonnes se fait manuellement. C'est la fin de la « plomberie ».

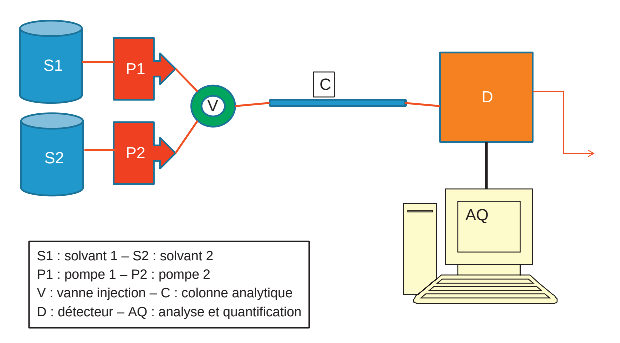


Fig. 39.14 Schéma d'un système de chromatographie liquide à haute performance.

Principes

Le mélange (extrait du sérum contenant l'antibiotique à doser) est déposé via un injecteur en tête de colonne (fig. 39.13). Il est poussé à travers la colonne contenant la phase stationnaire (assimilée à un liquide « fixé » sur la colonne) par la phase mobile propulsée par les pompes. Les substances du mélange ayant plus d'affinité pour la phase stationnaire fixée dans la colonne vont y rester plus longtemps que celles ayant plus d'affinité pour la phase dite mobile, qui circule à travers la colonne (fig. 39.14). On comprend ainsi l'importance de la nature de chacune de ces phases, dont les compositions respectives seront la base et la clé d'une bonne séparation donc d'un dosage correct. La caractéristique physicochimique principale intervenant dans le partage entre les deux phases est la polarité des molécules à séparer.

Étapes du dosage

Préparation de l'échantillon

Le sérum ne peut être injecté tel quel dans la colonne. Sa viscosité et sa richesse en composants variés aboutiraient à une obturation rapide des colonnes dont la durée de vie serait ainsi réduite (et le coût de dosage augmenté). Par ailleurs, la complexité de la composition du sérum aboutirait à des chromatogrammes très complexes et ininterprétables.

Les techniques de préparation sont nombreuses (tableau 39.11).

- Souvent, une simple déprotéinisation volume à volume avec du méthanol ou de l'acétonotrile, ou par un acide (perchlorique, trichloracétique, trifluoroacétique) est efficace. Il suffit pour cela de petits volumes de sérum (50 à 100 µl) que l'on mélange par agitation à un volume équivalent de solvant ou d'acide (fig. 39.15). Une centrifugation adaptée permet de récupérer un surnageant limpide qui peut être injecté dans la colonne. Cette technique est utile en pédiatrie lorsque l'on dispose de faibles volumes de sang. Elle a pour inconvénient de diluer de moitié l'antibiotique et d'abaisser la limite de quantification. Il faut également s'assurer que l'acide ne détruit pas l'antibiotique.
- Il peut également être utile de retraiter le surnageant de déprotéinisation avec un solvant organique non miscible (dichlorométhane par exemple), qui aura pour effet d'éliminer l'acétonitrile en excès et donc de concentrer l'antibiotique dans la phase aqueuse qui surnage. Cette deuxième étape permet d'obtenir des chromatogrammes plus « propres ».
- L'antibiotique peut être extrait directement du sérum de façon plus ou moins spécifique par un solvant organique (hexane, chloroforme, etc.). Il convient ensuite d'évaporer à sec ce solvant et de reprendre le résidu en phase aqueuse avant injection.
- Il faut éviter les simples dilutions du sérum avec un tampon pour le « fluidifier ». Cette technique n'évite pas le colmatage rapide de la colonne.

Tableau 39.11 **Les étapes principales de la préparation des échantillons sanguins.**

Étape 1	Étape 2	Étape 3	Étape 4	Étape 5	Remarques
Déprotéinisation : méthanol, acétonitrile	Centrifugation	Injection du surnageant 5 à 50 µl			Rapide, souvent suffisant
Déprotéinisation : méthanol, acétonitrile	Centrifugation	Reprise du surnageant par 4 à 5 volumes de solvant non miscible : dichlorométhane	Mélange, centrifugation	Injection du surnageant 5 à 50 µl	Chromatogrammes plus « propres »
Extraction de l'antibiotique (fluoroquinolones) du sérum par dichlorométhane	Centrifugation	Élimination phase aqueuse Réextraction de l'antibiotique du dichlorométhane par un acide ou une base	Centrifugation	Injection du surnageant	Chromatogrammes très « propres »
Dépôt du sérum sur cartouche	Préchromatographie sur cartouche	Injection de l'éluant sortant de la cartouche			

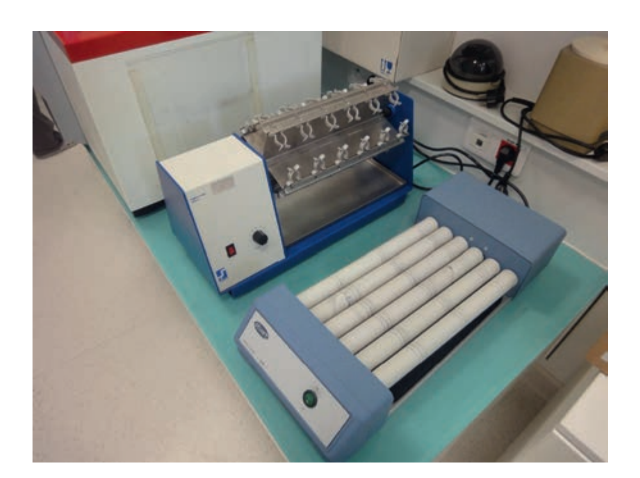


Fig. 39.15 Deux systèmes d'agitations des échantillons de sérum pour la déprotéinisation ou l'extraction organique. À gauche, les tubes fixés par les clips tournent verticalement autour du rotor, à droite, posés entre les rouleaux, ils tournent horizontalement.

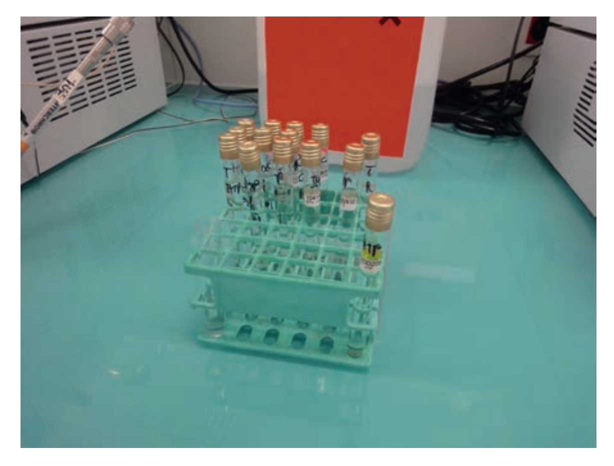


Fig. 39.16 Portoir garni de 14 échantillons sériques extraits, prêts à être injectés. Sur ce portoir, plusieurs molécules seront dosées, mais l'utilisation d'une technique d'extraction commune permet de les traiter toutes en même temps. Deux colonnes et des phases mobiles très proches en composition permettent d'effectuer ces dosages en environ 3 heures, calibrations et contrôles inclus.

- Enfin, certaines techniques de préparation utilisent une préchromatographie du sérum menée à la seringue manuellement sur de petites cartouches préconditionnées par des supports souvent identiques à ceux des colonnes analytiques.

Injection du surnageant d'extraction

Le volume d'injection est variable, de 5 à 50 µl généralement. Il se fait par l'intermédiaire d'une boucle calibrée fixée sur la vanne d'injection, garantissant la reproductibilité du volume d'injection (fig. 39.13), à partir du surnageant d'extraction (fig. 39.16).

Chromatographie sur colonnes analytiques

Les colonnes analytiques sont de taille et de diamètre variables (3,5 à 25 cm et quelques millimètres, fig. 39.13), selon les besoins. Le paramètre déterminant est la phase stationnaire qui la garnit.

En chromatographie par échange d'ion, la colonne est remplie par une résine échangeuse d'ion. Elle est rarement utilisée pour le dosage des antibiotiques.

La plus fréquente est la chromatographie de partage, au cours de laquelle les composés du mélange se partagent de façon différentielle entre les deux phases, mobile (solvant) et stationnaire (colonne). En chromatographie dite en « phase inverse », la plus courante car la plus performante, la colonne est remplie de billes de silice recouvertes par des greffons apolaires (octadecylsilanes), que l'on apparente à un liquide apolaire. La phase mobile est polaire (tampon) avec proportion variable d'un solvant apolaire. La taille des particules définit les performances de la colonne : plus elles sont petites, plus la colonne est performante (et plus elle peut être courte), mais plus la pression est élevée. La taille varie de 2 à 10 microns généralement. De nombreuses marques existent, qui ne sont pas de qualité et de prix identiques. Sur

ce type de colonne, plus la polarité de la phase mobile se rapproche de la polarité de la colonne, plus sa force élutive est grande, et moins les différents constituants du mélange (antibiotique et autres molécules sériques) seront séparés. À l'inverse, moins la phase mobile sera élutive, plus longtemps les différents constituants seront retenus sur la colonne, leur différence de rétention s'allongera, et la séparation sera meilleure. Dans ce dernier cas, cela se fait au détriment de la rapidité. Il convient, lors du développement des techniques, d'optimiser ce rapport de force. La polarité des colonnes étant fixée, il faudra donc jouer sur celle des phases mobiles (voir infra). En chromatographie de partage en phase normale, le solvant est apolaire (organique), et la phase stationnaire polaire. Elle est rarement utilisée pour le dosage des antibiotiques.

Détection/quantification

En sortie de colonnes, les différents constituants qui ont été séparés passent dans un détecteur où ils sont quantifiés. Le signal émis par le détecteur est mesuré en continu. La ligne de base correspond à l'absorption de la phase mobile passant dans la cuve du détecteur. Chaque fois qu'un composé passe dans la cuve, entraîné par la phase mobile, un pic apparaît; l'antibiotique à doser est identifié par son temps de passage dans le détecteur après l'injection (fig. 39.17). La quantification se fait par mesure de la hauteur ou la surface du pic. La détection/quantification peut se faire par absorptiométrie dans l'ultraviolet, par fluorimétrie, par néphélémétrie, par électrochimie, par spectrométrie de masse. Le plus souvent, il s'agit d'absorptiométrie à 214, 220 ou 254 nm (photomètre à longueur d'onde fixe ou spectrophotomètre). Cette technique est simple d'application, à condition que l'antibiotique absorbe dans l'ultraviolet, ce qui est très souvent le cas, et très reproductible. Les appareils vont du plus simple (photomètre à filtres, donc longueur d'onde fixe) au plus sophistiqué (spectrophotomètre à barrettes de diode et réalisation du spectre en vol lorsque sort le produit de la colonne).

La spectrométrie de masse comme méthode de détection et de quantification prend de plus en plus de place. Par sa grande spécificité, elle permet souvent le dosage de plusieurs molécules simultanément, qu'elles appartiennent à la même famille, ou qu'elles aient des spectres antibactériens identiques (anti-Gram positif, par exemple) et donc qu'elles soient susceptibles d'être associées.

La visualisation sur écran du chromatogramme (fig. 39.17) permet d'apprécier la qualité de la séparation, et les logiciels d'exploitation permettent de retravailler le chromatogramme pour le rendre plus fiable. L'enregistrement sur disque dur assure une bonne traçabilité du dosage.

Composition des phases mobiles

Le dosage des antibiotiques se fait dans la très grande majorité des cas en phase inverse. La phase mobile est donc polaire, composée majoritairement d'un tampon aqueux (coût faible) avec une proportion variable de solvant apolaire. Deux types d'élution sont possibles :

- en chromatographie isocratique, la composition de la phase mobile est fixe pendant tout le dosage;
- en chromatographie en gradient, le pourcentage de solvant apolaire change au cours du dosage. Il est donc pompé séparément, d'où nécessité d'une deuxième pompe, les deux fluides étant ensuite réunis dans un mélangeur. Cette technique, facile, est utile pour les séparations « difficiles », ou lors de dosages de plusieurs constituants au cours du même *run*.

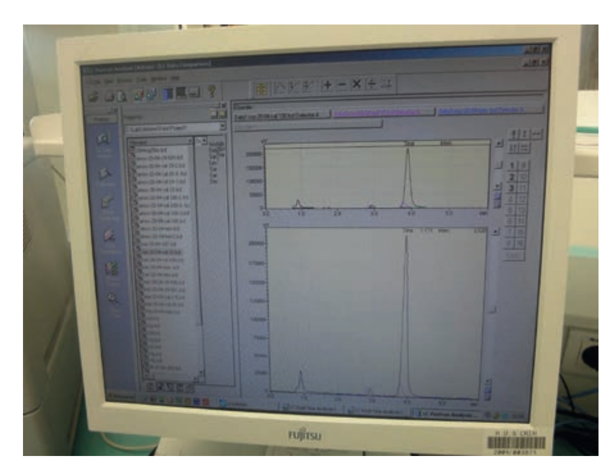


Fig. 39.17 Chromatogramme d'un dosage de céfotaxime. Grand chromatogramme du bas : à 1 et 3 minutes apparaissent des pics inhérents au sérum, non éliminés par l'extraction, mais dont la présence n'est pas gênante, car élués loin du pic de céfotaxime qui apparaît à 4 minutes. Il s'agit de la superposition de deux dosages, l'un a 11,5 mg/l (petit pic), l'autre à 95,8 mg/l (grand pic). La ligne de base obtenue par du sérum témoin sans antibiotique indique clairement l'absence d'interférences au temps de rétention du céfotaxime.

Lors de la fabrication de la phase mobile, le respect du pourcentage précis de solvant apolaire est important. Une variation de 1 % de ce solvant peut changer de façon rédhibitoire la force élutive de la phase mobile, et donc l'aspect du chromatogramme, et, partant, la fiabilité de la quantification. De la même façon, le réglage du pH par le tampon doit être très précis.

Mise en place en pratique du dosage des antibiotiques par CLHP au laboratoire de bactériologie

Nous n'envisagerons dans ce paragraphe que la problématique de l'adaptation dans un laboratoire donné d'une technique déjà éprouvée et publiée. Il ne s'agit pas ici de décrire la chronologie des événements à respecter pour développer une technique « maison », ce qui est plus complexe et plus long.

Recherche des techniques publiées

Il existe de très nombreuses techniques publiées pour la quasi-totalité des antibiotiques. Il est rigoureusement impossible d'en faire la liste exhaustive. Le choix d'une technique passe d'abord par le choix de la revue à explorer dans cet objectif.

Les revues à privilégier sont les suivantes :

- *Journal of Chromatographie, Biomedical Application.* C'est la revue par excellence dédiée aux dosages des xénobiotiques par CLHP, avec, bien sûr, la place qu'il convient de consacrer aux antibiotiques;
- *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ainsi que *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, qui publient également

de façon régulière des articles consacrés au dosage des antibiotiques par CLHP.

De façon encore plus simple, mais moins spécifique, entrer quelques mots clés judicieusement adaptés à la problématique du dosage à résoudre dans un moteur de recherche est toujours fructueux (à cet égard, taper «*antibiotics, HPLC, serum*» dans le plus célèbre de ces moteurs génère plus d'un million de réponses). La vraie difficulté réside dans le tri final. Rechercher dans les revues spécialisées ci-dessus autorise en général un accès à des articles plus en accord avec les préoccupations des microbiologistes.

Choix des quelques techniques à mettre à l'épreuve

Il n'y a pas de règle absolue, mais quelques précautions sont utiles.

- Vérifier que la technique concerne bien des dosages sériques et éventuellement d'autres liquides biologiques si nécessaire. En effet, de nombreuses techniques sont destinées au contrôle de qualité de préparations pharmaceutiques, s'adressant donc à des produits d'emblée très purs.
- S'assurer qu'il s'agisse de chromatographie en phase inverse (solvant apolaire = acétonitrile ou méthanol), la plus praticable.
- Jeter un coup d'œil rapide sur les chromatogrammes en illustration de la publication afin de vérifier que la séparation des pics de l'antibiotique des autres pics inhérents au sérum soit parfaite, avec de la «marge» de part et d'autre du pic d'antibiotique (cela permet de pallier les variations, normales, inhérentes aux différences de lieux et de matériels).
- S'assurer que la technique d'extraction est praticable (il en existe presque toujours une qui soit relativement simple), à savoir souvent déprotéinisation ± *back extraction*.
- S'assurer que la publication donne les qualités de la technique (précision, exactitude, limites de linéarité, limites de détection et quantification, spécificité, nécessité d'ajout d'un standard interne).
- Si le type de colonne sur lequel la technique doit être adaptée est déjà imposé, essayer de trouver une publication utilisant le même type – ce point est précieux.

Comment se simplifier la vie au laboratoire

Le respect de ces quelques règles permet souvent de gagner un temps précieux à l'adaptation d'une technique dans un laboratoire. Il ne faut pas hésiter à utiliser la phase mobile d'une publication avec l'extraction d'une autre. Il existe des extractions applicables à plusieurs antibiotiques d'une même famille, par exemple les β-lactamines entre elles, mais aussi à des molécules appartenant à des familles différentes. Si l'on y ajoute la précaution d'utiliser des phases mobiles ayant la même nature de solvants et de tampons [40, 42], l'équilibrage des colonnes pour passer de la phase mobile d'un antibiotique à celle d'un autre, en routine, ne prend que quelques minutes. Les points de calibrations quotidiens pour chaque antibiotique peuvent être préparés sous forme d'aliquotes de sérum aux concentrations utiles de chaque antibiotique, congelés en petits volumes (250 à 500 µl) qui ne mettent que quelques minutes à décongeler et être prêts à l'emploi. Il suffit de les renouveler tous les 6 mois car, congelés à –80 °C, ils sont parfaitement stables (une demi-journée de travail semestriel pour une technicienne).

S'il s'avère nécessaire, en fonction des molécules que le laboratoire souhaite doser, d'utiliser deux types de solvants différents avec deux types de tampons différents, il peut être pertinent de consacrer une colonne analytique à chacun des couples solvant–tampon. Cela permettra également un gain de temps au quotidien.

Dans ces conditions il devient possible de doser les antibiotiques majeurs relevant de la CLHP au coup par coup, «à la carte», au fur et à mesure que les sérums arrivent au laboratoire. Ce mode de fonctionnement satisfait aux exigences d'un suivi thérapeutique cohérent des antibiotiques, répondant à la nécessité d'adaptation posologique la plus rapide possible (fig. 39.18).

Avantages et inconvénients

Avantages

Plus que tout autre technique, la CLHP, par la visualisation des chromatogrammes, permet de savoir immédiatement si le dosage «s'est bien passé», contrairement aux automates fermés pour les aminosides et les glycopeptides. Les contrôles qualité et les points de calibration permettent de contrôler la technique. Toute interférence intempestive (substance inhabituelle dans le sang du patient, ou insuffisance rénale sévère accumulant un composé en faibles concentrations habituellement, etc.) est apparente sur le pic d'antibiotique, et autorise une mesure corrective (par exemple diminution du taux de solvant organique pour mieux séparer les deux pics, ajustement du pH, etc.).

- Il n'y a a priori aucune limitation dans les possibilités de dosage. À l'exception de quelques très rares molécules (fosfomycine) qui ne «conviennent» pas à la CLHP, tous les antibiotiques peuvent bénéficier de cette technique.
- Elle est rapide, et bénéficie régulièrement d'innovations techniques qui la rendent très praticable.



Fig. 39.18 Deux paillasses dédiées au dosage des antibiotiques par CLHP et immuno-enzymologie, intégrées dans le secteur ouvert de sérologie du laboratoire de bactériologie. Plus de 20 antibiotiques peuvent être dosés au quotidien, «la carte». Les demandes les plus fréquentes concernent les aminosides, les glycopeptides; parmi les β-lactamines l'imipénème, le céfotaxime, la ceftazidime, le céfépime, et la pipéracilline (tazocilline), la rifampicine, la ciprofloxacine et la lévofloxacine.

Inconvénients (vrais et faux)

La CLHP souffre d'une réputation de technique onéreuse, difficile à mettre en œuvre, nécessitant un personnel très qualifié, plus adaptée aux techniciens de pharmacologie ou de biochimie ; il s'agit, pour certains de ces points, d'une contrevérité. La difficulté réelle réside dans le *développement* d'une nouvelle technique. L'*adaptation* est considérablement plus aisée. À l'heure où aucun laboratoire de bactériologie ne recule devant l'emploi de la biologie moléculaire, exigeante en termes de précautions d'utilisation (PCR, séquençage, kits moléculaires en tous genres, etc.), il n'y a aucune raison de considérer la CLHP comme inaccessible techniquement. Il est en revanche évident que son application au service du dosage des antibiotiques doit rester l'apanage des laboratoires de bactériologie *en routine* ; en effet, c'est là que se trouve tout l'environnement nécessaire à la compréhension du besoin du dosage, à sa prescription correcte, à son interprétation (CMI, espèce bactérienne concernée, phénotype sauvage ou non, antécédent de telle ou telle souche dans le service concerné, etc.), au dialogue bactérioclinique.

Le coût d'investissement n'est pas plus important que celui d'autres techniques devenant habituelles en laboratoire de bactériologie.

En termes d'accréditation, plusieurs organismes d'évaluation externe de la qualité proposent leurs services.

Les résultats sont régulièrement meilleurs que ceux obtenus par les automates pour les aminosides-glycopeptides.

Électrophorèse capillaire [42]

Cette technique peut être un complément utile à la CLHP pour les molécules trop polaires ne pouvant être chromatographiées (fosfomycine, fosmidomycine). Il s'agit d'une véritable électrophorèse réalisée dans un tube capillaire sous une différence de potentiel très élevée. Très spécifique, elle souffre cependant d'une limite de détection parfois insuffisante, et d'un coût d'investissement et d'utilisation élevé.

Conclusion

Le développement de la PK/PD des antibiotiques a eu, entre autres, le mérite de donner un cadre cohérent au choix et au suivi thérapeutique des traitements par les antibiotiques (cela est également vrai pour les autres anti-infectieux). Il n'est bien entendu pas question de doser tous les antibiotiques chez tous les patients, mais de se consacrer du mieux possible aux situations qui le méritent réellement. L'augmentation de la résistance, voire de la multirésistance, couplée à l'absence de nouvelles molécules, nous oblige à « mieux faire » avec ce dont nous disposons. Il a fallu attendre ces extrémités pour voir apparaître la notion de « bon usage des antibiotiques ». Ce bon usage passe de façon incontournable par le dosage des antibiotiques. Ce dernier a eu la faveur des cliniciens dans un souci de prévention de la toxicité ; il est évident qu'il doit bénéficier d'un engouement encore plus fort en termes d'efficacité bactérioclinique et de prévention de l'émergence de résistance. Les technologies existantes le permettent et il est du rôle du bactériologiste de le promouvoir avec l'aide des cliniciens concernés.

Références

[1] Craig WA, Legget J, Totsuka K, et al. Key pharmacokinetic parameters of antibiotic efficacy in experimental animal infections. J Drug Dev 1988 ; 1 : 7–15.

[2] Lacy MK, Nicolau DP, Nightingale CH, et al. The pharmacodynamics of aminoglycosides. Clin Inf Dis 1998 ; 27 : 23–7.

[3] Drusano GL. Human pharmacodynamics of beta-lactams, aminoglycosides, and their combinations. Scand J Infect Dis 1991 ; 74 : 235–48.

[4] MacKenzie FM, Igould IM. The post-antibiotic effect. J Antimicrob Chemother 1993 ; 32 : 519–37.

[5] Karlowsky JA, Saunders MH, Harding GA, et al. In vitro characterization of aminoglycoside adaptative resistance in P. aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 1996 ; 40 : 1387–93.

[6] Beaucaire G. The role of aminoglycosides in modern therapy. J Chemother 1995 ; 7(Supp. 2) : 111–23.

[7] Kashuba ADM, Bertino JS, Nafzinger AN. Dosing of aminoglycoside to rapidly attain pharmacodynamic goals and hasten therapeutic response by using individualized pharmacokinetic monitoring of patients with pneumonia caused by Gram negative organisms. Antimicrob Agents Chemother 1998 ; 42 : 1842–4.

[8] Tessier PR, Nicolau DP, Onyeji CO, et al. Pharmacodynamics of intermittent- and continuous-infusion cefepime alone and in combination with once-daily tobramycin against Pseudomonas aeruginosa in an in vitro infection model. Chemotherapy 1999 ; 45 : 284–95.

[9] Xiong YQ, Caillon J, Zhou XT, et al. Treatment of experimental rabbit infective endocarditis due to a multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa with high dose ceftazidime alone and combined with amikacin or sulbactam or both. J Antimicrob Chemother 1995 ; 35 : 697–706.

[10] Manduru M, Mihm LB, White RL, et al. In vitro pharmacodynamics of ceftazidime against Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother 1997 ; 41 : 2053–6.

[11] Mouton JW, Den Hollender JG. Killing of Pseudomonas aeruginosa during continuous and intermittent infusion in an in vitro pharmacodynamic model. Antimicrob Agents Chemother 1994 ; 38 : 931–6.

[12] Mouton JW, Vinks ATMM. Is continuous infusion of beta-lactams worthwile ? Efficacy and pharmacokinetic considerations. J Antimicrob Chemother 1996 ; 38 : 5–15.

[13] Lee SY, Kuti JL, Nicolau DP. Cefepime pharmacodynamics in patients with expended spectrum beta-lactamases (ESBL) and non-ESBL infection. J Infect 2007 ; 54 : 463–8.

[14] Tam VH, McKinnon PS, Akins RL, et al. Pharmacodynamics of cefepime in patients with Gram negative infections. J Antimicrob Chemother 2002 ; 50 : 425–8.

[15] Craig WA, Ebert SC. Continuous infusion of beta-lactam antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1992 ; 36 : 2577–83.

[16] Benko AS, Cappelletty DM, Kruse JA, et al. Continuous infusion versus intermittent administration of ceftazidime in critically ill patients with suspected gram-negative infections. Antimicrob Agents Chemother 1996 ; 40 : 691–5.

[17] Ryback MJ. Pharmacodynamics : relation to antimicrobial resistance. Am J Inf Control 2006 ; 34 : S38–45.

[18] Roberts JA, Paratzab J, Paratza E, et al. Continuous infusion of β-lactam antibiotics in severe infections : a review of its role. Int J Antimicrob Agents 2007 ; 30 : 11–8.

[19] Carlet J. Intérêt clinique de l'administration intra-veineuse continue de la ceftazidime. Antibiotiques 2002 ; 4 : 5–8.

[20] Olofsson SK, Geli P, Andersson DI, et al. Pharmacodynamic model to describe the concentration-dependent selection of cefotaxime-resistant Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother 2005 ; 49 : 5081–91.

[21] Eagye KJ, Nicolau DP, Lockhart SR, et al. A pharmacodynamic analysis of resistance trends in pathogens from patients with infection in intensive care units in the United States between 1993 and 2004. Annals Clin Microbiol and Antimicrob 2007 ; 6 : 11–7.

[22] Kasiakou SK, Sermaides GJ, Michalopoulos A, et al. Continuous versus intermittent intravenous administration of antibiotics : a meta-analysis of randomised controlled trials. Lancet Infect Dis 2005 ; 5 : 581–9.
[23] Noreddin AM, Marras TK, Sanders K, et al. Pharmacodynamic target attainment analysis against Streptococcus pneumoniae using levofloxacin 500 mg, 750 mg and 1000 mg once daily in plasma and epithelial lining fluid of hospitalized patients with community acquired pneumonia. Int J Antimicrob Agents 2004 ; 24 : 479–84.
[24] Frei CR, Burgess DS. Pharmacodynamic analysis of ceftriaxone, gatifloxaicne, and levofloxacine against Streptococcus pneumoniae with the use of Monte Carlo simulation. Pharmacotherapy 2005 ; 25 : 1161–7.
[25] Conte Jr. JE, Golden JA, McIver M. Intrapulmonary pharmacokinetics and pharmacodynamics of high dose levofloxacin in healthy volunteers subjects. Int J Antimicrob Agents 2006 ; 28 : 114–21.
[26] Garrison MW. Pharmacodynamic assessment of the activity of high dose (750 mg) levofloxacin, ciprofloxacin and gatifloxacin against clinical strains of Pseudomonas aeruginosa. Diagn Microb Infect Disease 2006 ; 54 : 51–6.
[27] Knudsen JD, Fursted K, Espersen F, et al. Activities of vancomycin and teicoplanin in vitro and in vivo and correlation to pharmacokinetic parameters in the mouse peritoneal model. Antimicrob Agents Chemother 1997 ; 41 : 1910–5.
[28] Knudsen JD, Fursted K, Raber S, et al. Pharmacodynamics of glycopeptides in the mouse peritonitis model of Streptococcus pneumoniae or Staphylococcus aureus infection. Antimicrob Agents Chemother 2000 ; 44 : 1247–54.
[29] Chambers HF, Kennedy S. Effects of dosage, peak and trough concentrations in serum, protein binding, and bactericidal rate on efficacy of teicoplanin in a rabbit model of endocarditis. Antimicrob Agents Chemother 1990 ; 34 : 510–4.
[30] Harding I, McGovan MP, White LO, et al. Teicoplanin therapy of Staphylococcus aureus septicemia : relationship between pre-dose serum concentration and outcome. J Antimicrob Chemother 2000 ; 45 : 835–41.
[31] Jehl F. Pharmacocinétique et pharmacodynamie des glycopeptides. Antibiotiques 2003 ; 5 : 89–98.
[32] Jehl F, Chabaud A, Grillon A. L'antibiogramme : diamètres ou CMI ? J Anti-infectieux 2015 ; 17 : 125–39.
[33] Jehl F, Chabaud A. L'antibiogramme en 2016 : place des concentrations minimales inhibitrices. Feuillets Biol 2016 ; 330 : 25–32.
[34] Jehl F, Twizeyimana E. Sensibilité des bactéries aux antibiotiques : les CMI sont complémentaires de l'antibiogramme. Rev Fr Lab 2015 ; 476 : 47–61.
[35] Patel TS, Nagel JL. Clinical outcome of enterobacteriaceae infections stratified by carbapenems MICs. J Clin Microbiol 2015 ; 53 : 201–5.
[36] Torres E, Delgado M, Valiente A, et al. Impact of borderline minimal inhibitory concentration on the outcome of invasive infections caused by Enterobacteriaceae treated with beta-lactams : a systematic review and meta-analysis. Eur J Clin MIcrobiol Infect Dis 2015 ; 34 : 1751–8.
[37] Davis WW, Stout DR. Disc plate method of microbiological antibiotic assay ; II. Novel procedure offering improved accuracy. Applied Microbiology 1971 ; 22 : 666–70.
[38] Edberg SC. The measurement of antibioticsin human body fluids : technics and significance. In : Lorian V, editor. Antibiotic in laboratory medicine. 2nd ed. New York : William and Wilkins ; 1986. p. 381–466.
[39] Kitzis MD. Le dosage des antibiotiques. In : Courvalin P, Leclerq R, Bingen E, editors. 2e éd. 2006. p. 653–66.
[40] Jehl F, Gallion C, Monteil H. High performance liquid chromatography of antibiotics. Journal of Chromatography 1990 ; 531 : 509–48.
[41] Levêque D, Gallion-Renault C, Monteil H, et al. Analysis of recent antimicrobial agents in human biological fluids by high performance liquid chromatography. J Chromatogr 1998 ; 815 : 163–72.
[42] Levêque D, Gallion-Renault C, Monteil H, et al. Capillary electrophoresis for pharmacokinetic studies. J Chromatogr 1997 ; 697 : 163–72.

Chapitre 40

Liste des maladies bactériennes à déclaration obligatoire (MDO)

Botulisme
Brucellose
Charbon
Choléra
Diphtérie
Fièvre typhoïde et fièvres paratyphoïdes
Infection invasive à méningocoque
Légionellose
Listériose
Peste
Tétanos
Toxi-infection alimentaire collective
Tuberculose
Tularémie
Typhus exanthématique

Arrêté du 22 août 2011. JO 27 août 2011

République française

Médecin ou biologiste déclarant (tampon)	**Si notification par un biologiste**
Nom :	**Nom du clinicien :**
Hôpital/service :	
Adresse :	Hôpital/service :
Téléphone :	Adresse :
Télécopie :	Téléphone :
Signature :	Télécopie :

Maladie à déclaration obligatoire

cerfa

Infection invasive à méningocoque

N° 12201*03

Important : cette maladie justifie une intervention urgente locale, nationale ou internationale. **Vous devez la signaler par tout moyen approprié (téléphone, télécopie…)** au médecin de l'ARS avant même confirmation par le CNR ou envoi de cette fiche.

Initiale du nom : |__| Prénom : .... Sexe : ☐ M ☐ F Date de naissance : |__|__|__|__|__|__|__|__|

Code d'anonymat : |__|__|__|__| |__|__|__|__| |__|__|__|__| |__|__|__|__| **Date de la notification :** |__|__|__|__|__|__|__|__|

(A établir par l'ARS)

Code d'anonymat : |__|__|__|__| |__|__|__|__| |__|__|__|__| |__|__|__|__| **Date de la notification :** |__|__|__|__|__|__|__|__|

(A établir par l'ARS)

Sexe : ☐ M ☐ F Date de naissance : |__|__|__|__|__|__|__|__| ou âge : |__|__| Code postal du domicile du patient : |__|__|__|__|__|

Confirmation du diagnostic :

- Culture positive dans :
  ☐ sang ☐ LCR ☐ lésion cutanée purpurique
  Liquide : ☐ articulaire ☐ pleural ☐ péricardique ☐ péritonéal
- PCR positive dans :
  ☐ sang ☐ LCR ☐ lésion cutanée purpurique
  Liquide : ☐ articulaire ☐ pleural ☐ péricardique ☐ péritonéal
- Présence de diplocoques Gram – au direct :
  ☐ oui ☐ non ☐ non recherché
- LCR évocateur de méningite bactérienne purulente :
  ☐ oui ☐ non ☐ non recherché
- Antigènes solubles :
  ☐ présence ☐ absence ☐ non recherchés

Infection invasive à méningocoque

Critères de notification

1. Isolement bactériologique de méningocoques ou PCR positive à partir d'un site normalement stérile (sang, LCR, liquide articulaire, liquide pleural, liquide péritonéal, liquide péricardique) ou à partir d'une lésion cutanée purpurique.
2. Présence de diplocoques Gram négatif à l'examen microscopique du LCR.
3. LCR évocateur de méningite bactérienne purulente (à l'exclusion de l'isolement d'une autre bactérie) ET :
   - soit présence d'éléments purpuriques cutanés quel que soit leur type ;
   - soit présence d'antigènes solubles méningococciques dans le LCR, le sang ou les urines.
4. Présence d'un *purpura fulminans* (*purpura* dont les éléments s'étendent rapidement en taille et en nombre, avec au moins un élément nécrotique ou ecchymotique de plus de trois millimètres de diamètre, associé à un syndrome infectieux sévère, non attribué à une autre étiologie).

- *Purpura fulminans* : ☐ oui ☐ non Signes de choc : ☐ oui ☐ non Eléments purpuriques cutanés : ☐ oui ☐ non

Sérogroupe : ☐ A ☐ B ☐ C ☐ X ☐ Y ☐ W135 ☐ autre, préciser : .... ☐ non groupé

Hospitalisation (phase aiguë) : Date : |__|__|__|__|__|__|__|__| Hôpital : ....

Le patient avait-il reçu un traitement antibiotique avant les premiers prélèvements biologiques : ☐ oui ☐ non ☐ inconnu

Si oui, s'agit-il d'une injection antibiotique précoce pour suspicion de *purpura fulminans* : ☐ oui ☐ non ☐ inconnu

Statut vaccinal : le sujet est-il vacciné par un vaccin antiméningococcique : ☐ oui ☐ non ☐ ne sait pas

Si oui : ☐ conjugué C Date dernière injection : |__|__|__|__|__|__|__|__| Nombre total de doses reçues : |__|__|

☐ conjugué ACYW135 Date dernière injection : |__|__|__|__|__|__|__|__|

☐ A+C Date dernière injection : |__|__|__|__|__|__|__|__|

☐ ACYW135 Date dernière injection : |__|__|__|__|__|__|__|__|

Evolution : ☐ guérison ☐ décès ☐ séquelles, préciser : ....

Prophylaxie des sujets contacts	Nom de l'antibiotique Type de vaccin	Collectivité : nombre de personnes	Entourage proche : nombre de personnes
Chimioprophylaxie		|__|__|__|	|__|__|__|
Vaccination		|__|__|__|	|__|__|__|
Type de contacts		☐ crèche ☐ milieu scolaire ☐ autre, préciser :	☐ famille ☐ amis

Autres cas dans l'entourage : ☐ oui ☐ non ☐ inconnu Si oui, pour chaque autre cas, indiquer l'âge, la date d'hospitalisation et le département de résidence

Cas n°1 : âge (en années) : |__|__| date d'hospitalisation : |__|__|__|__|__|__|__|__| département : |__|__|__|

Cas n°2 : âge (en années) : |__|__| date d'hospitalisation : |__|__|__|__|__|__|__|__| département : |__|__|__|

....

Médecin ou biologiste déclarant (tampon) :	**Si notification par un biologiste**	**ARS (signature et tampon)**
Nom :	**Nom du clinicien :**	
Hôpital/service :		
Adresse :	Hôpital/service :	
Téléphone :	Adresse :	
Télécopie :	Téléphone :	
Signature :	Télécopie :	

Maladie à déclaration obligatoire (Art L 3113-1, R 3113-1, R 3113-2, R 3113-5, D 3113-7 du Code de la santé publique)

Information individuelle des personnes - Droit d'accès et de rectification pendant 6 mois par le médecin déclarant (loi du 6 janvier 1978) - Centralisation des informations à l'Institut de veille sanitaire

Fig. 40.1 Modèle de fiche de déclaration obligatoire faite par le biologiste ou le clinicien : exemple de la fiche « Infection invasive à méningocoque ».

Centres nationaux de référence (CNR)

Arrêté du 26 décembre 2011 – *JORF* n° 0302 du 30 décembre 2011, p. 22804, texte n° 60.
Modifié par l'arrêté du 24 juillet 2014 – *JORF* n° 0193 du 22 août 2014 p. 13955, texte n° 25.

Centre national de référence anaérobies et botulisme
• CNR coordonnateur
Institut Pasteur
Unité de recherche et d'expertise bactéries anaérobies et toxines
25, rue du Docteur Roux
75724 Paris cedex 15
Nom du responsable : Dr Michel Popoff
Tél. : 01 45 68 83 07 – Fax : 01 40 61 35 01
E-mail : michel-robert.popoff@pasteur.fr
• CNR laboratoire associé
Hôpital Saint-Antoine – UHLIN
184, rue du faubourg Saint-Antoine
75571 Paris cedex 12
Nom du responsable : Dr Frédéric Barbut
Tél. : 01 49 28 30 11 – Fax : 01 49 28 20 84
E-mail : frederic.barbut@sat.aphp.fr

Centre national de référence *Borrelia*
Hôpitaux universitaires de Strasbourg
Institut de bactériologie de la faculte de médecine
1, rue Koeberle
67000 Strasbourg
Nom du responsable : Pr Benoit Jaulhac
Tél. : 03 69 55 14 27 (ligne directe) – 03 69 55 03 33 (plateau technique) – 03 69 55 14 52 – Fax : 03 69 55 16 98
E-mail : benoit.jaulhac@medecine.u-strasbg.fr ; benoit.jaulhac@chru-strasbourg.fr

Centre national de référence *Brucella*
• CNR coordonnateur
Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES)
Laboratoire de sante animale de Maisons-Alfort
Unité zoonoses bactériennes
23, avenue du Général de Gaulle
94706 Maisons-Alfort cedex
Nom du responsable : Dr Bruno Garin-Bastuji
Tél. : 01 49 77 46 23 – Fax : 01 49 77 13 44
E-mail : bruno.garin-bastuji@anses.fr
• CNR laboratoire associé
INSERM U1047
Université Montpellier – UFR médecine
186, chemin du Carreau de Lanes
30908 Nîmes cedex 2
Nom du responsable : David O'Callaghan
Tél. : 04 66 02 81 46 – Fax : 04 66 02 81 48
E-mail : david.ocallaghan@univ-montp1.fr

Centre national de référence *Campylobacter* et *Helicobacter*
Université de Bordeaux 2 (Bordeaux Segalen)
Laboratoire de bactériologie
146, rue Léo Saignat
33076 Bordeaux cedex
Nom du responsable : Pr Francis Mégraud
Tél. : 05 56 79 59 10 – 05 57 57 11 19 – Fax : 05 56 79 60 18 – 05 56 51 41 82
E-mail : francis.megraud@chu-bordeaux.fr ; francis.megraud@labhel.u-bordeaux2.fr

Centre national de référence charbon
Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA)
Unité de bactériologie
DGA MNRBC/PLATLAB
5, rue lavoisier
91710 Vert-le-Petit
Nom du responsable : Dr François Thibault
Tél. : 01 69 90 84 34 / 01 69 90 82 53
E-mail : fthibault@crssa.net – CNRcharbon@irba.fr

Centre national de référence *Chlamydiae*
Université Bordeaux 2 (Bordeaux Segalen)
USC infections humaines à mycoplasmes et à *Chlamydiae*
146 rue Léo Saignat
33076 Bordeaux cedex
Nom du responsable : Dr Bertille de Barbeyrac
Tél. : 05 56 79 56 67 – Fax : 05 56 79 56 11
E-mail : bertille.de.barbeyrac@u-bordeaux2.fr

Centre national de référence coqueluche et autres bordetelloses
Institut Pasteur
Unité de recherche prévention et thérapie moléculaires des maladies humaines
25 rue du Docteur Roux
75724 Paris cedex 15
Nom du responsable : Dr Nicole Guiso
Tél. : 01 45 68 83 34 – Fax : 01 40 61 35 33
E-mail : nicole.guiso@pasteur.fr

Centre national de référence corynebactéries du complexe diphtheriae
Institut Pasteur
Unité de recherche prévention et thérapie moléculaires des maladies humaines
25 rue du Docteur Roux
75724 Paris cedex 15
Nom du responsable : Dr Nicole Guiso
Tél. : 01 45 68 83 34 – Fax : 01 40 61 35 33
E-mail : nicole.guiso@pasteur.fr

Centre national de référence *Escherichia coli, Shigella* et *Salmonella*
• CNR coordonnateur
Institut Pasteur
Unité de recherche et d'expertise des bactéries pathogènes entériques
28 rue du Docteur Roux
75724 Paris cedex 15
Nom du responsable : Dr François-Xavier Weill
Nom du co-directeur : Dr Simon Le Hello
Tél. : 01 45 68 83 45 – Fax : 01 45 68 83 45 // Tél. : 01 40 61 37 24 – Fax : 01 45 68 88 37
E-mail : salmonella@pasteur.fr ; colishig@pasteur.fr ; francois-xavier.weill@pasteur.fr ; slehello@pasteur.fr
• CNR laboratoire associé
Hôpital Robert Debré
Service de microbiologie
48, boulevard Sérurier
75019 Paris
Nom du responsable : Dr Patricia Mariani-Kurkdjian
Tél. : 01 40 03 23 40 – Fax : 01 40 03 24 50
E-mail : patricia.mariani@rdb.ap-hop-paris.fr

Centre national de référence *Francisella tularensis*
• CNR coordonnateur
CHU de Grenoble
Pôle de biologie – laboratoire de bactériologie
Département des agents infectieux
Institut de biologie et de pathogène
BP 217
38043 Grenoble
Nom du responsable : Pr Max Maurin
Tél. : 04 76 76 54 79 – Fax : 04 76 76 52 28
E-mail : mmaurin@chu-grenoble.fr
• CNR laboratoire associé
Université de la Méditerranée
Faculté de médecine de Marseille
URMITE CNRS UMR 6236
27, boulevard Jean Moulin
13385 Marseille cedex 5
Nom du responsable : Pr Bernard La Scola
Tél. : 04 91 32 43 75 ou 04 91 32 49 77 – Fax : 04 91 38 77 72
E-mail : bernard.la-scola@univ-amu.fr

Centre national de référence gonocoques
• CNR coordonnateur
Institut Alfred Fournier
Laboratoire de microbiologie
25, boulevard Saint-Jacques
75014 Paris
Nom du responsable : Dr Agathe Goubard
Tél. : 01 40 78 26 25 – Fax : 01 40 78 26 27
E-mail : agathe.goubard@institutfournier.org
• CNR laboratoire associé
Groupe hospitalier Saint-Louis–Lariboisière–Fernand Widal (AP-HP)
Laboratoire de bactériologie – virologie – hygiene
2, rue Ambroise Paré
75018 Paris cedex 18
Nom du responsable : Pr Emmanuelle Cambau
Tél. : 01 49 95 65 54 – Fax : 01 49 95 85 37
E-mail : emmanuelle.cambau@lrb.aphp.fr

Centre national de référence *Haemophilus influenzae*
CHRU de Lille
Laboratoire de bactériologie-hygiène
Institut de microbiologie
Centre de biologie pathologie
Boulevard du professeur Jules Leclercq
59037 Lille cedex
Nom du responsable : Dr Olivier Gaillot
Tél. : 03 20 44 54 80 – 03 20 44 49 45 – Fax : 03 20 44 48 95
E-mail : olivier.gaillot@chru-lille.fr

Centre national de référence *Legionella*
Hospices civils de Lyon (HCL)
Centre de biologie et de pathologie Est
Institut de microbiologie
Laboratoire de bactériologie
59, boulevard Pinel
69677 Bron cedex
Nom du responsable : Dr Sophie Jarraud
Tél. : 04 72 35 72 52 – Fax : 04 72 35 73 35
E-mail : sophie.jarraud@univ-lyon1.fr

Centre national de référence leptospirose
Institut Pasteur
Unité de biologie des spirochètes
28, rue du Docteur Roux
75724 Paris cedex 15
Nom du responsable : M. Mathieu Picardeau
Tél. : 01 45 68 83 68 – Fax : 01 40 61 30 01
E-mail : mathieu.picardeau@pasteur.fr

Centre national de référence *Listeria*
Institut Pasteur
Groupe micro-organismes et barrières de l'hôte
25, rue du Docteur Roux
75724 Paris cedex 15
Nom du responsable : Pr Marc Lecuit
Tél. : 01 40 61 34 20 – Fax : 01 40 61 34 21
E-mail : marc.lecuit@pasteur.fr

Centre national de référence méningocoques
Institut Pasteur
Unité des infections bactériennes invasives
28, rue du Docteur Roux
75724 Paris cedex 15
Nom du responsable : Dr Muhamed-Kheir Taha
Tél. : 01 40 61 31 08 (secrétariat) – Fax : 01 40 61 30 34
E-mail : muhamed-kheir.taha@pasteur.fr

Centre national de référence mycobactéries et résistance aux antituberculeux
• CNR coordonnateur
Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière–Charles Foix (AP–HP)
Laboratoire de bactériologie-hygiène
47-83, boulevard de l'hôpital
75634 Paris cedex 13
Nom du responsable : Pr Vincent Jarlier
Tél. : 01 42 16 20 70 – Fax : 01 42 16 20 83
E-mail : vincent.jarlier@psl.aphp.fr
• CNR laboratoire associé
Groupe hospitalier Saint-Louis–Lariboisière–Fernand Widal (AP-HP)
Laboratoire de bactériologie – virologie – hygiene
2, rue Ambroise Paré
75018 Paris cedex 18
Nom du responsable : Pr Emmanuelle Cambau
Tél. : 01 49 95 65 54 – Fax : 01 49 95 85 37
E-mail : emmanuelle.cambau@lrb.aphp.fr

Centre national de référence peste et autres yersinioses
Institut Pasteur
Unité de recherche *Yersinia*
28, rue du Docteur Roux
75724 Paris cedex 15
Nom du responsable : Dr Élisabeth Carniel
Tél. : 01 45 68 83 26 – Fax : 01 45 68 89 54
E-mail : elisabeth.carniel@pasteur.fr

Centre national de référence pneumocoques
Hôpital européen Georges Pompidou
Laboratoire de microbiologie
20, rue Leblanc
75908 Paris cedex 15
Nom du responsable : Dr Emmanuelle Varon
Tél. : 01 56 09 39 67 – Fax : 01 56 09 24 46
E-mail : emmanuelle.varon@egp.aphp.fr

Centre national de référence résistance aux antibiotiques
• CNR coordonnateur
CHU Besançon
Laboratoire de bactériologie
Boulevard Fleming
25030 Besançon cedex
Nom du responsable : Pr Patrick Plesiat
Tél. : 03 81 66 85 81 – Fax : 03 81 66 89 14
E-mail : patrick.plesiat@univ-fcomte.fr
• CNR laboratoires associés
– CHU Caen
Laboratoire de microbiologie
Avenue de la Côte de Nacre
14099 Caen cedex
Nom du responsable : Dr Vincent Cattoir
Tél. : 02 31 06 48 95 – Fax : 02 31 06 45 72
E-mail : cattoir-v@chu-caen.fr
– CHU Clermont-Ferrand
Laboratoire de bactériologie
58, rue de Montalembert
63000 Clermont-Ferrand cedex
Nom du responsable : Pr Richard Bonnet
Tél. : 04 73 75 17 93 – Fax : 03 73 75 49 22
E-mail : rbonnet@chu-clermontferrand.fr
– CHU Bicêtre
Service de bactériologie-virologie
Unité INSERM U914 « résistance aux antibiotiques »
78, rue du Général Leclerc
94275 Le Kremlin-Bicêtre
Nom du responsable : Dr Laurent Dortet
Tél. : 01 45 21 20 19 / 01 45 21 36 25 – Fax : 01 45 21 63 40
E-mail : laurent.dortet@bct.aphp.fr / cnr.carba@bct.aphp.fr

Centre national de référence *Rickettsia*, *Coxiella* et *Bartonella*
Universite de la Méditerranée (IHU POLMIT)
Institut hospitalo-universitaire
Faculté de médecine de Marseille
CNRS UMR 6236
27, boulevard Jean Moulin
13385 Marseille
Nom du responsable : Pr Pierre-Édouard Fournier
Tél. : 04 91 38 55 17 – Fax : 04 91 38 77 72
E-mail : pierre-edouard.fournier@univ-amu.fr

Centre national de référence staphylocoques
Centre de biologie et de pathologie Est
Institut de microbiologie
Laboratoire de bactériologie
59, boulevard Pinel
69677 Bron cedex
Nom du responsable : Pr François Vandenesch
Tél. : 04 72 25 72 52 – Fax : 04 72 35 73 35
E-mail : francois.vandenesch@univ-lyon1.fr

Centre national de référence streptocoques
Groupe hospitalier Cochin-Hôtel Dieu-Broca (AP–HP)
Service de bactériologie
27, rue du faubourg Saint-Jacques
75014 Paris
Nom du responsable : Pr Claire Poyart
Tél. : 01 58 41 15 61 – 01 58 41 15 60 – Fax : 01 58 41 15 48
E-mail : claire.poyart@cch.aphp.fr

Centre national de référence syphilis
Groupe hospitalier Cochin–Hôtel Dieu–Pavillon Gustave Roussy
Service de dermatologie – laboratoire de dermatologie
UPRES-EA 1833
8, rue Méchain
75014 Paris
Nom du responsable : Pr Nicolas Dupin
Tél. : 01 58 41 18 49 – 01 58 41 27 88 – 01 44 41 25 60 – Fax : 01 44 41 25 46
E-mail : nicolas.dupin@cch.aphp.fr

Centre national de référence vibrions et choléra
Institut Pasteur
Unité de recherche et d'expertise des bactéries pathogènes entériques
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris cedex 15
Nom du responsable : Mme Marie-Laure Quilici
Tél. : 01 40 61 33 85 – 01 45 68 82 21 – 01 45 68 83 45 – fax : 01 45 68 88 37
E-mail : quilici@pasteur.fr

Chapitre 42

Sites Internet

AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) – www.afssaps.sante.fr

APUA (Alliance for the Prudent Use of Antibiotics) – www.tufts.edu/med/apua

ATCC-LGC Promochem (Collection ATCC) – www.lgcpromochem.com/atcc

Campus de microbiologie médicale/bactériologie-virologie-hygiène hospitalière – www.microbe-edu.org

CDC (Center for Diseases Control and Prevention) – www.cdc.org

CIP (Collection de l'Institut Pasteur) – www.crbip.pasteur.fr

COFRAC (Comité de l'accréditation des laboratoires, organismes certificateurs et d'inspection) – www.cofrac.fr

CRAB (Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques) – www.pasteur.fr/units/aab

EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) – www.earss.rivm.nl

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) – www.ecdc.europa.eu

EUROSURVEILLANCE (Peer-reviewed European information on communicable disease surveillance and control) – www.eurosurveillance.org

FDA (Food and Drug Administration) – www.fda.gov

GBEA (Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale) – www.sante.gouv.fr/htm/info_pro/gbea/an_intro.htm

HAS (Haute autorité de santé) – www.has-sante.fr

NARSA (Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*) – www.narsa.net

OMS (Organisation mondiale de la santé) – www.who.int

ONERBA (Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques) – www/onerba.org

ROAR (Reservoirs of Antibiotic Resistance Network) – www.tufts.edu/med/apua puis cliquer sur l'onglet “ROAR”

SFM (Société Française de Microbiologie) – www.sfm.asso.fr

USDA FSIS (United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service) – www.fsis.usda.gov

Liste et adresses des principales sociétés

Fournisseur	Adresse	Téléphone	N° de fax	Site Internet	Adresse e-mail
ABBOTT Division Diagnostic	12, rue de la Couture, BP 50203, 94518 Rungis cedex	01 45 60 25 00	01 45 60 04 98		sylvie.gouevic@abbott.com
ABD Serotec France	15, rue des Pas-Perdus, BP 38338, Les Bureaux de l'Horloge, 95804 Cergy	01 34 25 83 34	01 34 25 44 00	www.serotec.com.fr	info@fr.serotec.com
ADGENIX	30, avenue Robert-Surcouf, BP 67, 78960 Voisins-le-Bretonneux	01 39 44 15 30	01 39 44 15 40	www.adgenix.com	adgenix@adgenix.fr
AES CHEMUNEX	Rue Maryse-Bastié, Ker-Lann, 35219 Bruz	02 23 50 12 12	02 23 50 12 00	www.aeslaboratoire.com	samuel.tesson@aeslabora-toire.com
ALL. DIAG	10, rue Etorré-Bugatti, BP 6, 67038 Strasbourg cedex 3	03 88 78 80 88	03 88 78 76 78	www.alldiag.com	info@alldiag.com
ANDA BIOLOGICALS	37, rue de la Course, BP 30076, 67067 Strasbourg cedex	03 88 32 81 22	03 88 32 19 80	www.andabiologicals.com	andabio@wanadoo.fr
APPLIED BIOSYSTEMS	25, rue de la Baltique, BP 96, 91943 Courtabeuf cedex	01 69 59 85 85	01 69 59 85 00	www.europe.applied-biosystems.com	abdirect@ eur.appliedbio-systems.com
Autostainer Dagatronics Corporation [Korea]	263–1 Ducki-dong, Ilsan-gu Goyang-si Gyeonggi-do 411–808 Korea			www.Dagatron.en.ec21.com	
BD Diagnostics Diagnostic Systems	11, rue Aristide-Bergès, BP 4, 38800 Le-Pont-de-Claix	04 76 68 36 36	04 76 68 35 04	www.bd.com/France	bdfra_Diagnostic_Systems@europe.bd.com
BIO ADVANCE	Espace Villaparc – l'Érable, 1, avenue Marne et Gondoire, 77600 Bussy Saint-Martin	01 64 61 66 66	01 64 61 62 20	www.bio-advance.fr	bio-advance@wanadoo.fr
Bio Rad	3, boulevard Raymond-Poincaré, 92430 Marnes-la-Coquette	01 47 95 61 48	01 47 95 62 87	www.biorad.fr	guillaume.camard@bio-rad.com
bioMérieux SA	Chemin de l'Orme, 69280 Marcy l'Étoile	04 78 87 20 00	04 78 87 20 90	www.biomerieux.com	GCF@eu.biomerieux.com

Fournisseur	Adresse	Téléphone	N° de fax	Site Internet	Adresse e-mail
BMD	Actipole 25, 4–6, boulevard de Beaubourg-Croissy Beaubourg, 77435 Marne- la-Vallée cedex 2	01 64 62 10 12	01 64 62 09 66	www.bmdnet.com	bmd@bmdnet.com
Carlo Erba Réactifs	Chaussée du Vexin, Parc d'Affaires des Portes, BP 616, 27106 Val-de-Reuil cedex	02 32 09 20 00	02 32 09 20 20	www.cersds.com	carloerba@ carloerbareactifs. com
Cepheid Europe	La Serre, 81470 Maurens Scopont	06 63 82 53 00		www.cepheid.com	
Consortium de matériel pour laboratoires (CML)	1, rue des Palis, BP 30, 77792 Nemours cedex	01 64 45 42 42	01 64 78 14 69	www.cml.fr	serviceclient@cml.fr
Coopération Pharmaceutique Française	Place Lucien-Auvert, 77020 Melun	01 64 87 20 00	01 64 87 20 70	www.cooper.fr	
COPAN DIAGNOSTICS INC.	USA, Canada, Latin America, 26055 Jefferson Avenue Murrieta, CA 92562 États-Unis	(951) 696–6957	(951) 600–1832		info@copanusa.com
Dade Behring	19–29, rue du Capitaine-Guynemer, Immeuble Berkeley, 92903 Paris-la-Défense	01 42 91 21 00	01 42 91 22 00	www.dadebehring. com	marketingfrance@ dadebeh-ring.com
Diasorin	11, rue Georges-Besse, 92160 Antony	01 55 59 04 00	01 55 59 04 40	www.diasorin.com	christian.barraud@ diasorin.it
Dipsi Industrie	70–86, avenue de la République, Vecteur Sud, 92325 Châtillon cedex	01 49 65 67 20	01 49 65 67 29	www.dipsi.com	bizemont@dipsi.com
Elitech France SAS	305, allées de Craponne, 13300 Salon-de-Provence	04 90 17 54 50	04 90 17 54 51	www.biotech international.com	a.degaillande@ ldhgroup.com
Elvetec service	6, rue Henri-Becquerel, ZI MI Plaine, BP 224, 69744 Genas	04 72 22 43 00	04 72 22 43 70	www.espacelabo. com	elvetec@elvetec.fr
Eurobio	7, avenue de la Scandinavie, 91953 Les Ulis cedex B	01 69 07 94 77	01 69 07 95 34	www.eurobio.fr	adv@eurobio.fr
Fischer Scientific Europe	Bd. Sébastien Brant, 67403 Illkirch Cedex	03 88 67 14 14	03 88 67 11 68		fr.fischer@ thermofischer.com
Fumouze Diagnostics – Sofibel	110–114, rue Victor-Hugo, 92686 Levallois-Perret cedex	01 49 68 43 25	01 49 68 43 22	www.fumouze.fr	fumouze@sofibel.fr
GE Health Care Europe GmbH (anciennement Amersham Biosciences)	Rue René-Razel, Parc Technologique de Saclay, 91898 Orsay cedex	01 69 35 67 00	01 69 41 96 77	www.gehealthcare. com/ lifesciences	isabelle.henry@ ge.com
Greiner Bio One	3–7, avenue du Cap Horn, Les Ulis, 91941 Courtabœuf	01 69 86 25 25	01 69 86 25 32	www.gbo.com	accueil@gbo.com
Groupe Servibio	103, rue Henri-Barbusse, 92190 Meudon	01 46 26 42 81	01 45 34 25 20	www.servibio.com	servibio@wanadoo.fr

HAIN Diagnostika	72147 Nehren, Allemagne; distribué par Biocentric 270, rue Jenner 83150 Bandol	04 94 63 46 46	04 94 63 46 47	www.biocentric.com	
Heipha Diagnostika/ Biotest	80, rue Hélène Boucher, ZI Centre 78530 Buc	01 39 20 20 80	01 39 20 20 81	www.sfrl.fr	
Immunotech S.A.S.	130, av. de Lattre de Tassigny 13009 Marseille 9			www.beckman.com	
Ingen	Sogaris 203, Bât. G1, 94654 Rungis cedex	01 46 87 11 42	01 46 87 12 31	www.ingen.fr	ingen@ingen.fr
Innogenetics	8, rue du Maréchal de Lattre-de-Tassigny 59800 Lille	01 64 59 14 54		www.innogenetics.com	
International Microbio	Parc d'activités, Allée d'Athènes, 83870 Signes	04 94 88 55 00	04 94 88 55 05	www.intmicrobio.com	im@intmicrobio.com
Interscience	30, chemin du Bois des Arpents, 78860 Saint-Nom-La-Bretèche	01 34 62 62 61	01 34 62 43 03	www.interscience.fr	info@interscience.fr
Inverness Medical France	19, rue Lambrechts, 92400 Courbevoie	01 41 99 92 92	01 41 99 92 95		info@inverness fr.com
Iris Diagnostics France	38, avenue Division Leclerc, 95170 Deuil-La-Barre	01 39 64 13 25		www.irisdiagnostics.com	
IUL, SA	Torrent de l'Estadella, 22 08030 Barcelone, Espagne	+34 93 274 0232	+34 93 274 0144		
KIESTRA Lab Automation BV	Marconilaan 6, 9207 JC Drachten, Pays-Bas	+31(0) 512–510710	+31(0) 512–524585	www.kiestra.nl	
Labo Moderne	37, rue Dombasle, 75015 Paris	01 45 32 62 54	01 45 32 01 09	www.labomoderne.com	info@labomoderne.com
Labobasi	2121, chemin Saint-Bernard, Parc Scientifique, technologique de Sophia Antipolis, 06220 Vallauris	04 93 00 66 30	04 93 00 66 39	www.labobasi.com	alain.labobasi@wanadoo.fr
LGC Promochem	6, rue Alfred-Kastler, BP 83076, 67123 Molsheim cedex	03 88 04 82 82	03 88 04 82 90	www.lgcpromochem.com	christine.nguyen@lgcpromo-chem.com
Lustiner France	4, square Denis Papin, BP 4, 78331 Fontenay-le-Fleury cedex	01 34 62 00 63	01 34 62 00 67	www.lustiner.com	lustiner.france@wanadoo.fr
Oxoid & Remel	6, route de Paisy, BP 13, 69571 Dardilly cedex	04 72 52 33 70	04 78 66 03 76	www.oxoid.com www.thermofischer.com	oxoid.fr@thermofischer.com
Promega France	24, chemin des Verrières, Parc des Verrières, 69260 Charbonnières-les-Bain	04 37 22 50 00	04 37 22 50 15	www.promega.com	fr_custserv@fr.promega.com
Pyrosequencing/ Biotage SARL	19, avenue d'Italie, 75013 Paris	01 43 31 35 49	01 43 31 35 21	www.biotagebio.com	stanislas.marin@eu.bio-tage.com
Qiagen SA	3 avenue du Canada, LP 809, 91974 Courtabœuf cedex	01 60 92 09 20	01 60 92 09 25	www.qiagen.com	

Fournisseur	Adresse	Téléphone	N° de fax	Site Internet	Adresse e-mail
Réactifs RAL	Site Montesquieu, Bordeaux Technopolis, 33651 Martillac cedex	05 57 96 04 04	05 57 96 04 05	www.reactifsral.fr	commercial@reactifsral.fr
Roche Diagnostics	2, avenue du Vercors 38242 Meylan Cedex	04 76 76 30 30	04 76 76 30 01	www.roche-diagnostics.fr	
Sartorius	4, rue Émile-Baudot, 91127 Palaiseau cedex	01 69 19 21 00	01 69 20 09 22	www.sartoriusfrance.fr	service.client@sartorius.com
Siemens Healthcare Diagnostics	9, boulevard Finot, Immeuble Grand Angle, 93200 Saint-Denis cedex 2	01 49 22 31 00	01 69 79 05 35	www.siemens.com/diagnostics	marie.treboute@siemens.fr
Sobioda	97, rue Lavoisier, 38330 Montbonnot-Saint-Martin	04 76 61 02 02	04 76 61 91 81	www.sobioda.com	info@sobioda.com
Tebu Bio SAS	39, rue de Houdan, BP 15, 78612 Le-Perray-en-Yvelines cedex	01 30 46 39 00	01 30 46 39 11	www.tebubio.com	france@tebubio.com
Tecan France SAS	26, avenue Tony-Garnier, 69007 Lyon	04 72 76 04 80	04 72 76 04 99	www.tecan.com	tecan.France@tecan.com
The Binding Site	14, rue des Glairaux, BP 226, 38522 Saint-Égrève	04 38 02 19 19	04 38 02 19 20	www.bindingsite.fr	info.bindingsite.fr
TREK Diagnostic Systems Magellan biosciences	982 Keynote Circle, Suite 6, Cleveland, OH 44131, États-Unis	800.871.8909	216.351.5456	www.magellanbio.com	
Vircell S.L.	Avicena 18016, Granada, Spain	+34 958 44 12 64	+34 958 51 07 12		info@vircell.com

Des références d'autres fournisseurs peuvent être trouvées dans :

- l'*Annuaire des laboratoires de biologie médicale* (www.direct-biologie.com), 46e éd. Paris : Elsevier Masson ; 2016 ;
- le *Guide de la biologie médicale*, Spectra Biologie, Presse Communication International ; 2016.